

**Analyse der subzellulären Lokalisation  
des C-Signalvorläuferproteins p25 und  
die Identifikation der PopC-Spaltstelle in p25  
in *Myxococcus xanthus***

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

MEIKE AMMON

aus Nordenham

Marburg/Lahn im Oktober 2010

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Oktober 2006 bis März 2008 am Max-Planck Institut für terrestrische Mikrobiologie in Marburg in der Abteilung Ökophysiologie unter der Leitung von PD Dr. Reiner Hedderich und von März 2008 bis August 2010 unter der Leitung von Prof. Lotte Søgaaard-Andersen, M.D., Ph.D durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen am: 30. Dezember 2010

Erstgutachter: Prof. Lotte Søgaaard-Andersen, M.D., Ph.D

Zweitgutachter: Prof. Dr. Erhard Bremer

Weitere Mitglieder der Prüfungskommission:

Prof. Dr. Klaus Lingelbach

Prof. Dr. Andrea Maisner

Tag der mündlichen Prüfung: 04. März 2011



## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>3</b>
<b>1 Abstract.....</b>	<b>4</b>
<b>2 Zusammenfassung.....</b>	<b>5</b>
<b>3 Einleitung .....</b>	<b>6</b>
3.1 Interzelluläre Kommunikation .....	6
3.2 <i>Myxococcus xanthus</i> .....	7
3.3 Lebenszyklus und Entwicklung von <i>M. xanthus</i> .....	8
3.4 Interzelluläre Kommunikation in <i>M. xanthus</i> .....	11
3.5 Das C-Signal .....	13
3.6 Der Entwicklungszyklus von <i>M. xanthus</i> .....	16
3.7 PopC .....	18
3.8 Klassifizierung der Serinproteasen .....	20
3.9 Subtilisin-ähnliche Serinproteasen in anderen Organismen .....	21
3.10 Substratspezifität der Subtilisine .....	23
3.11 Ziele dieser Arbeit .....	25
<b>4 Material und Methoden .....</b>	<b>27</b>
<b>4.1 Material und Chemikalien .....</b>	<b>27</b>
4.1.1 Enzyme .....	27
4.1.2 Verwendete Geräte .....	28
4.1.3 Medien.....	28
<b>4.2 Mikrobiologische Methoden.....</b>	<b>31</b>
4.2.1 Vektoren, Plasmide und Bakterienstämme .....	31
4.2.2 Herstellung der Plasmidkonstrukte .....	35
4.2.3 Oligonukleotide.....	36
4.2.4 Kultivierung der Bakterien .....	38
4.2.5 Untersuchung der Entwicklung von <i>M. xanthus</i> .....	39
4.2.6 Bestimmung der Sporulation von <i>M. xanthus</i> .....	40
<b>4.3 Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>41</b>
4.3.1 Präparation, Extraktion und Konzentrationsbestimmung von DNA aus <i>E. coli</i> und <i>M. xanthus</i> .....	41
4.3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	42
4.3.3 Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten.....	43
4.3.4 Restriktion und Ligation von DNA-Fragmenten .....	44
4.3.5 Herstellung elektrokompenter <i>E. coli</i> Zellen .....	44
4.3.6 Herstellung chemischkompetenter <i>E. coli</i> Zellen .....	45
4.3.7 Transformation von <i>E. coli</i> .....	45



4.3.8	Transformation von <i>M. xanthus</i> .....	46
4.3.9	Sequenzierung von DNA.....	47
4.3.10	Gerichtete Mutagenese.....	47
<b>4.4</b>	<b>Biochemische Methoden .....</b>	<b>49</b>
4.4.1	Heterologe Produktion von Proteinen in <i>E. coli</i> .....	49
4.4.2	Zellaufschluss unter nativen Bedingungen .....	49
4.4.3	Produktion und Reinigung von MalE-tag Fusionsproteinen in <i>E. coli</i> .....	50
4.4.4	Reinigung von Einschlusskörpern und Rückfaltung von Proteinen .....	51
4.4.5	Konzentrationsbestimmung von Proteinen .....	52
4.4.6	Ultrafiltration von Proteinen.....	53
4.4.7	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	53
4.4.8	Nachweis von Proteinen durch Immunoblot Analyse (Western Blot) .....	54
4.4.9	Quantifizierung von Proteinbanden im Immunoblot.....	56
4.4.10	<i>In vitro</i> -Proteasetest .....	56
4.4.11	<i>Cell shaving</i> .....	57
4.4.12	Proteinanalyse durch Massenspektrometrie.....	58
4.4.13	Analyse von Sequenzen .....	60
4.4.14	Erstellung des Homologiemodells von p25.....	60
<b>5</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>62</b>
<b>5.1</b>	<b>Zelluläre Lokalisation von p25 .....</b>	<b>62</b>
<b>5.2</b>	<b>Spaltstelle von PopC in p25 .....</b>	<b>67</b>
5.2.1	Identifikation der PopC-Spaltstelle unter Verwendung synthetischer Peptide.....	68
5.2.2	Massenspektrometrische Analyse von p17 aus <i>E. coli</i> .....	72
5.2.3	Verkürzte MalE-p25 Deletionsderivate zur Eingrenzung der relevanten Aminosäuren für die PopC Funktionalität .....	79
5.2.3.1	Überexpression und Reinigung der verkürzten MalE-p25 Fusionsproteine und PopC <sup>WT</sup> / PopC <sup>S423A</sup> .....	80
5.2.3.2	PopC-abhängige Spaltung der verkürzten MalE-p25 Deletionsderivate .....	81
5.2.4	Alaninsubstitutionen <i>in vitro</i> .....	85
5.2.5	Alaninsubstitutionen <i>in vivo</i> .....	87
<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>91</b>
<b>6.1</b>	<b>p25 Lokalisation auf der Zelloberfläche von <i>M. xanthus</i>.....</b>	<b>91</b>
<b>6.2</b>	<b>Spaltstelle von PopC in p25 .....</b>	<b>93</b>
<b>6.3</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>100</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>101</b>
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>109</b>
	<b>Erklärung .....</b>	<b>110</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	Bovines Serumalbumin
DTT	Dithiothreitol
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
h	Stunden
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid
KAc	Kaliumacetat
Kan	Kanamycin
Kb	Kilobasenpaare
LB	Lysogeny Broth
MALDI	Matrix-Assisted Laser-Desorption Ionization
Min	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
OD	Optische Dichte
PopC	<i>protease required for processing of C-signal precursor</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
s	Sekunde
Tc	Tetrazyklin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid

## 1 Abstract

*Myxococcus xanthus* is a Gram-negative, rod-shaped  $\delta$ -proteobacterium, which shows a complex developmental program. This program is initiated under starvation conditions and results in the formation of multicellular, spore-filled fruiting bodies. After six hours of starvation the C-signal coordinates and regulates the aggregation of cells into fruiting bodies, sporulation of cells into myxospores and a specific gene expression. The C-signal is a 17 kDa protein p17, which is generated by proteolytic cleavage of a 25 kDa precursor p25 by the subtilisin-like serine-protease PopC. The aim of this study was to investigate the subcellular localization of p25 in the outer membrane and to identify the PopC cleavage site in p25. To analyze the localization of p25, intact cells were treated with an unspecific protease. Immunoblot analysis with antibodies against p25 and against different control proteins were used to detect protein degradation. p25 was degraded like the outer membrane protein PilQ, which is exposed to the cell surface. Additionally, the outer membrane protein Tgl, which is exposed into the periplasmic space, and the inner membrane protein PilC were employed as controls. Tgl and PilC were degraded less drastically than PilQ and p25. These data suggest that p25 is exposed on the cell surface.

To identify the PopC cleavage site, biochemical and genetic approaches were used. Synthetic peptides were explored to map the PopC cleavage site and the N-terminus of p17 was analyzed by mass-spectrometry. Truncated MalE-p25 derivatives as well as mutants containing alanine substitutions at certain amino acid positions were investigated after cleavage by purified PopC protein *in vitro*. With these experiments the PopC cleavage site was narrowed down to the amino acid motif <sup>56</sup>LDV<sup>58</sup> in p25. Furthermore, analysis of different alanine substitution mutants *in vitro* and *in vivo* revealed that aspartate in the position 57 of p25 is essential for PopC cleavage in *M. xanthus*. These data strongly suggest that PopC cleaves p25 after aspartate 57 in the cleavage motif <sup>56</sup>LDV<sup>58</sup>.

## 2 Zusammenfassung

*Myxococcus xanthus* ist ein Bakterium, das ein außergewöhnliches Verhalten bei Nährstoffmangel zeigt. Im Zuge eines Entwicklungszyklus bilden diese Bakterien Fruchtkörper, die mit Dauerformen, den sogenannten Myxosporen gefüllt sind, um die lebensbedrohlichen Umweltbedingungen zu überstehen. Sechs Stunden nach Eintritt des Hungerzustandes koordiniert und reguliert das C-Signal die Aggregation der Zellen zur Fruchtkörperbildung, die Sporulation der Zellen zu Myxosporen und eine spezifische Genexpression. Beim C-Signal handelt es sich um das 17 kDa große Protein p17, welches nach der Prozessierung des C-Signalvorläuferproteins p25 durch die Subtilisin-ähnliche Serinprotease PopC entsteht. In dieser Arbeit sollte zum einen die Orientierung von p25 in der äußeren Membran untersucht und zum anderen die PopC-Spaltstelle in p25 identifiziert werden. Um die subzelluläre Lokalisation von p25 zu untersuchen, wurden intakte Zellen mit einer unspezifischen Protease behandelt. Anschließend wurde in Immunoblot Analysen geprüft, ob p25 im Vergleich zu Kontrollproteinen degradiert wird. p25 zeigte ein identisches Verhalten wie das Kontrollprotein PilQ, ein Protein der äußeren Membran, welches auf der Zelloberfläche exponiert ist. Als weitere Kontrollproteine dienten Tgl, ein Protein der äußeren Membran, das ins Periplasma ragt, und PilC, ein Protein der inneren Membran. Tgl und PilC wurden im Gegensatz zu PilQ und p25 weniger stark degradiert. Daher deuten die Ergebnisse darauf hin, dass p25 auf der Zelloberfläche exponiert ist.

Um die PopC-Spaltstelle zu identifizieren, wurden biochemische und genetische Strategien verfolgt. Synthetische Peptide wurden herangezogen, um die PopC-Spaltung zu analysieren. Der N-Terminus von p17 sollte mittels Massenspektrometrie bestimmt werden. Außerdem wurde die Spaltung von verkürzten MalE-p25 Deletionsderivaten und Alaninsubstitutionsmutanten durch gereinigtes PopC Protein *in vitro* untersucht. Damit wurde das Spaltmotiv in p25 auf die Aminosäuren <sup>56</sup>LDV<sup>58</sup> eingegrenzt. Die Untersuchungen von Alaninsubstitutionen *in vitro* und *in vivo* lassen schlussfolgern, dass Aspartat 57 essentiell für die PopC-Spaltung in *M. xanthus* ist. Daher deuten die Daten darauf hin, dass PopC p25 im Spaltmotiv <sup>56</sup>LDV<sup>58</sup> nach Aspartat 57 spaltet.

### 3 Einleitung

#### 3.1 Interzelluläre Kommunikation

Kommunikation zwischen Bakterien ist ein weitverbreitetes Phänomen. So kommunizieren Bakterien beim *quorum sensing* durch den Austausch chemischer Signalmoleküle, um Aktivitäten innerhalb von Bakterienpopulationen zu synchronisieren (Waters & Bassler, 2005). *Quorum sensing* beinhaltet die Produktion, Sekretion, Detektion und die Reaktion auf Hormon-ähnliche Moleküle, die Autoinduktoren (*autoinducer*) (Waters & Bassler, 2005). Acyl-Homoserin-Lacton (AHL) stellen die wichtigste Klasse von Autoinduktoren in Gram-negativen Bakterien dar. *Quorum sensing* kann folgendermaßen zusammengefasst werden: Zunächst werden die Autoinduktoren in der Zelle synthetisiert und gelangen auf passivem Wege durch die Membranen in den Zellüberstand. Dort steigt die Autoinduktoren-Konzentration in Abhängigkeit zur Populationsdichte an. Ist ein minimaler Schwellenwert überschritten, binden die Autoinduktoren an zytoplasmatische Rezeptoren. Dadurch wird eine Signaltransduktionskaskade ausgelöst, die zu einer Veränderung der Genexpression innerhalb der Population führt (Ng & Bassler, 2009). In *Vibrio fischeri* bindet AHL bei Überschreitung des Schwellenwerts an das Protein LuxR. Der LuxR-AHL-Komplex initiiert die Transkription des Luciferase-Operons, das zum einen für die Biolumineszenz in *Vibrio fischeri* essentiell ist. Zum anderen sorgt dieses Operon für eine positive Rückkopplung durch Bildung von LuxI, woraufhin mehr Autoinduktoren produziert werden (Waters & Bassler, 2005). Ein solcher Prozess, wie die Biolumineszenz, ist nur in einer Population wirkungsvoll und wäre bei der Einzelzelle ineffizient. Somit ist es Bakterien möglich als multizellulärer Organismus zu agieren (Waters & Bassler, 2005).

In Gram-positiven Bakterien dienen Peptide als Signalmoleküle. Diese Peptide können entweder modifiziert sein, z.B. Peptidylakton oder Thiolaktone bei *Staphylococcus aureus* oder unmodifiziert wie bei CSF (*Competence and Sporulation Factor*) in *Bacillus subtilis* (Williams, 2007). Die Rezeptoren für diese Signalpeptide, die sogenannten Zwei-Komponenten-Signalproteine, lokalisieren, im Gegensatz zu Autoinduktoren, in der Bakterienmembran. Dort leiten sie die Informationen durch verschiedene Phosphorylierungsschritte

weiter. Ein typisches Zwei-Komponenten-System besteht aus dem Membran-gebundenen Histidinkinase-Rezeptor und dem passenden zytoplasmatischen *Response Regulator* mit transkriptioneller Funktion (Ng & Bassler, 2009).

Im Gegensatz zu den zuvor erwähnten Kontakt-unabhängigen Kommunikationswegen über größere Distanzen innerhalb der Bakterienpopulation, gibt es auch die Möglichkeit Signale über den direkten Zellkontakt auszutauschen (Shah & Dworkin, 2009). Das Gram-negative Bodenbakterium *Myxococcus xanthus* bildet bei einem limitierten Nahrungsangebot in der Umgebung Fruchtkörper. Dabei aggregieren die einzelnen Zellen und bilden Fruchtkörper, die etwa  $10^5$  Zellen umfassen. In den Fruchtkörpern differenzieren die Zellen zu Myxosporen (Sager & Kaiser, 1993; Shimkets, 1990). Nach dem gegenwärtigen Modell zur Signaltransduktion während der Fruchtkörperbildung interagiert ein Signalmolekül, das C-Signal, auf der Zelloberfläche mit einem vermuteten Rezeptor auf der benachbarten Zelle (Lobedanz & Sogaard-Andersen, 2003). Diese Signaltransduktion führt unter anderem zur Einleitung der Fruchtkörperbildung in der benachbarten Zelle. Somit ist es möglich viele tausend Zellen zu koordinieren, so dass eine multizelluläre Struktur, der Fruchtkörper, gebildet werden kann.

### **3.2 *Myxococcus xanthus***

Die stäbchenförmigen Myxobakterien gehören phylogenetisch in die Gruppe der  $\delta$ -Proteobakterien, die sich meist unter strikt aeroben Bedingungen chemoheterotroph ernähren. Die einzige Ausnahme bildet der anaerobe Vertreter *Anaeromyxobacter dehalogenans* (Sanford *et al.*, 2002). Roland Thaxter veröffentlichte im Jahr 1892 erstmals, dass es sich bei den Myxobakterien um Gram-negative Bakterien und nicht um Pilze handelt, wie es bis dahin aufgrund der Fruchtkörperbildung vermutet wurde (Kaiser, 1993; Thaxter, 1892). Spätere taxonomische Untersuchungen beschreiben *M. xanthus* wie folgt:

Deltaproteobacteria  
Ordnung II: Myxococcales  
Familie: Myxococcaceae  
Gattung: *Myxococcus*  
Art: *Myxococcus xanthus*

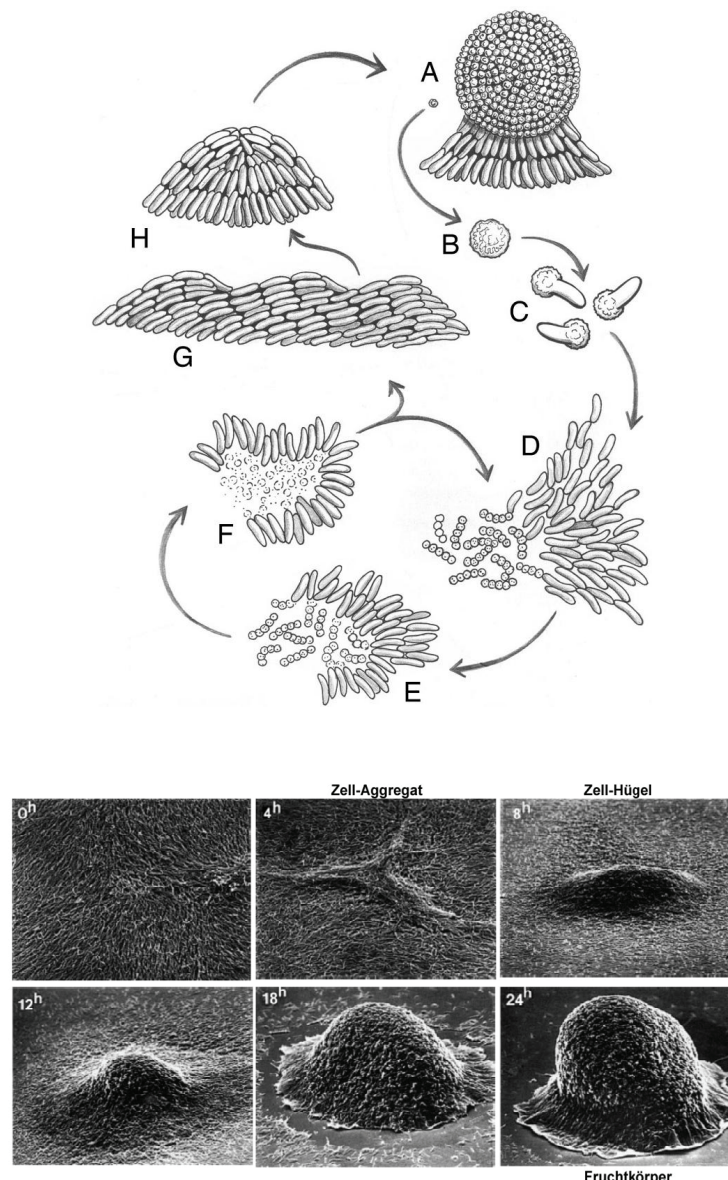
Auf die Komplexität von *M. xanthus* weist unter anderem ein sehr großes Genom hin, das  $9,14 \times 10^6$  Basenpaare umfasst und 7388 Protein-kodierende Gene besitzt (Goldman *et al.*, 2006). Das Genom liegt vollständig sequenziert vor und ist genetisch manipulierbar. Daher ist *M. xanthus* für viele etablierte molekularbiologische Methoden zugänglich und als Modellorganismus nutzbar.

### **3.3 Lebenszyklus und Entwicklung von *M. xanthus***

*M. xanthus* durchläuft zwei unterschiedliche Lebenszyklen (Abbildung 1). Während des vegetativen Lebenszyklus vermehren sich die Bakterien bei einem ausreichenden Nahrungsangebot als stäbchenförmige Einzelzellen und bilden Bakterienkolonien. Durch den Zusammenschluss vieler Zellen zu einer Kolonie ist es den Bakterien möglich, sich gemeinschaftlich zu ernähren und auszubreiten (Dworkin, 1996). Unter diesen Bedingungen jagen sie in Schwärmen andere Mikroorganismen „wie ein Rudel Wölfe“ (Dworkin, 1973; Hillesland *et al.*, 2007; Kaiser, 2004; Rosenberg *et al.*, 1977). Diese „Wolfsrudel“-Hypothese besagt, dass *M. xanthus* bei einer hohen Zelldichte antibiotische Metabolite und hydrolytische Enzyme sekretiert, die sich im extrazellulären Milieu dieser Zellschwärme anreichern. Folglich werden die Beutezellen lysiert und deren Peptide und Aminosäuren den *M. xanthus* Zellen zugänglich gemacht und verstoffwechselt (Hart & Zahler, 1966; Sudo & Dworkin, 1972). Ein aktuelles Modell vermutet, dass sich die lysierenden Substanzen nicht in einem extrazellulären Milieu anreichern. Stattdessen soll ein direkter Zellkontakt zwischen *M. xanthus* und der Beute nötig sein, um diese durch die Sekretion lytischer Enzyme und sekundärer Metaboliten zu zersetzen (Berleman & Kirby, 2009). Der spezifische Mechanismus ist jedoch bis heute unklar.

Unter nährstofflimitierten Bedingungen, bei einer ausreichend hohen Zelldichte und auf festen Oberflächen, aggregieren die Zellen während des Entwicklungszyklus (Sogaard-Andersen *et al.*, 2003). Dieser ist mit der Bildung von Fruchtkörpern, die mit Myxosporen gefüllt sind, abgeschlossen (Abbildung 1).





**Abbildung 1: Vegetativer Zellwachstumszyklus und Entwicklungszyklus von *Myxococcus xanthus*.** oben: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte im myxobakteriellen Lebenszyklus. Der Fruchtkörper (A) besteht aus stressresistenten Myxosporen (B), die bei einem verbesserten Nahrungsangebot auskeimen können (C) und sich dann im vegetativen Lebenszyklus als Schwarm (D) von anderen Mikroorganismen (als Kokken dargestellt) ernähren und ausbreiten. Der Schwarm umzingelt die Beutezellen und lysiert diese (E-F). Nährstoffarmut führt zu einem veränderten Bewegungsverhalten und der Ausbildung von Zell-Aggregaten (G) und Zellhügeln (H). Am Ende des Entwicklungszyklus steht der Fruchtkörper mit den differenzierten Myxosporen (Goldman *et al.*, 2006). unten: Die verschiedenen morphologischen Stadien im Entwicklungszyklus bis zur Bildung des Fruchtkörpers. Die Zeitangabe gibt Auskunft über die Dauer der Entwicklung nach Beginn des Nährstoffmangels (Kuner & Kaiser, 1982).

Die Fruchtkörperbildung verläuft nach einer streng morphologischen Abfolge, die zeitlich und räumlich koordiniert wird (Sogaard-Andersen *et al.*, 2003). Am Anfang des Entwicklungszyklus entstehen vier bis sechs Stunden nach Beginn des Hungerzustandes Aggregationszentren, die sich durch

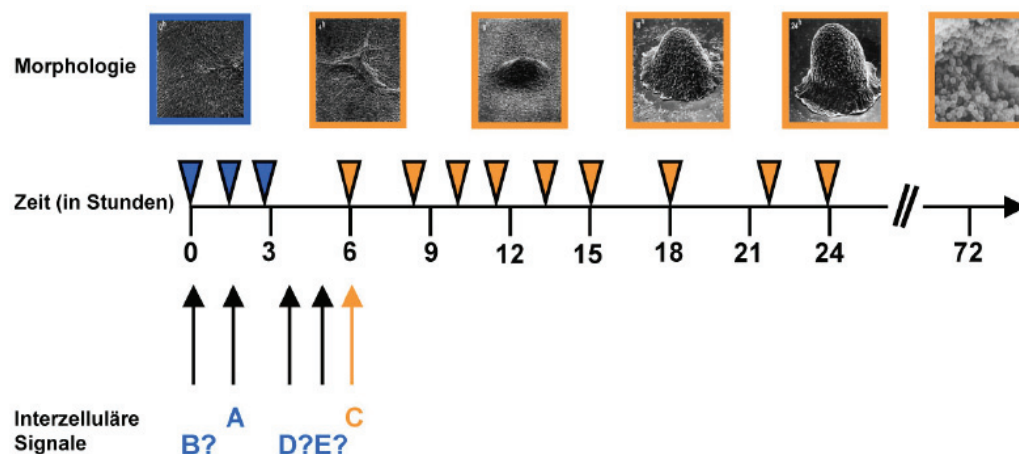


Migration weiterer Zellen vergrößern und schließlich symmetrische Hügel von etwa  $10^5$  Zellen bilden. Nach zirka 24 Stunden ist der Aggregationsprozess mit der Fruchtkörperbildung abgeschlossen (Kuner & Kaiser, 1982; Sager & Kaiser, 1993; Shimkets, 1990). Innerhalb des Fruchtkörpers differenzieren die Zellen zu Myxosporen binnen 72 Stunden (Kuner & Kaiser, 1982), die gegenüber Hitze von bis zu 60°C, Trockenheit, UV-Bestrahlung, Detergenzien und enzymatischem Verdau widerstandsfähig sind (Sudo & Dworkin, 1969). Auf diese Weise überdauern die Zellen bis zu einer Verbesserung des Nahrungsangebots, bei dem sie wieder auskeimen können (Kroos *et al.*, 1988; Shimkets & Dworkin, 1981). Von der anfänglichen Gesamtpopulation differenzieren nur die Zellen im Inneren des Fruchtkörpers zu Sporen (10%), während ungefähr 60% der Anfangspopulation aus vermutlich altruistischen Gründen lysieren und 30% der Zellen außerhalb des Fruchtkörpers als sogenannte *peripheral rods* stäbchenförmig bleiben und nicht sporulieren (Konovalova *et al.*, 2010; O'Connor & Zusman, 1991; Wireman & Dworkin, 1977). Die Aufgabe der nicht-aggregierenden *peripheral rods* könnte die Abwehr von attackierenden Fremdbakterien sein, um die Fruchtkörper-bildenden Zellen zu verteidigen (O'Connor & Zusman, 1991). Die Autolyse der Zellen während der Entwicklung erfolgt vermutlich im Zuge des „programmierten Zelltods“ (Nariya & Inouye, 2008). Im Gegensatz zum programmierten Zelltod in Eukaryoten wird der in Prokaryoten beispielsweise durch Toxin/Antitoxin-Systeme reguliert. Dieses System besteht bei *M. xanthus* aus der MazF mRNA Interferase als Toxin, dem Protein MrpC als Antitoxin sowie einer Kaskade von Serin-Threonin-Proteinkinasen (Nariya & Inouye, 2008). Die Regulation des MazF/MrpC-Systems erfolgt während der Entwicklung (Nariya & Inouye, 2008).

Aufgrund der Fähigkeit von *M. xanthus* während des Entwicklungsprogramms Fruchtkörper und Myxosporen zu bilden, sind diese Bakterien von großem Interesse, um z.B. Signaltransduktionswege mit den beteiligten Komponenten näher zu untersuchen oder neue Mechanismen der inter- und intrazellulären Kommunikation aufzuklären.

### 3.4 Interzelluläre Kommunikation in *M. xanthus*

Die verschiedenen Stadien des Entwicklungszyklus, angefangen bei der Aggregation bis hin zur Fruchtkörperbildung und Sporulation, müssen zeitlich sowie räumlich koordiniert und synchronisiert werden (Sogaard-Andersen *et al.*, 2003). Für die Kommunikation zwischen den Zellen sind diffusionsfähige und kontaktvermittelnde Signalmoleküle verantwortlich. Sie werden von hungrenden Zellen gebildet und weisen die umliegenden Zellen auf die sich ändernden Bedingungen hin. Weiterhin induzieren sie bei den Nachbarzellen ebenfalls die Bildung von entsprechenden Signalmolekülen. Durch extrazelluläre Komplementationen wurde nachgewiesen, dass *M. xanthus* Zellen verschiedene Signale miteinander austauschen. Diese Signale wurden entsprechend der Komplementationmutanten in fünf verschiedene Klassen eingeteilt (A-, B-, C-, D- und E-Signal), wobei die Mutanten einer Klasse die Entwicklung von Mutanten einer anderen Klasse komplementieren können (Downard *et al.*, 1993; Hagen *et al.*, 1978). Findet die Komplementation in einer Mutante nicht statt, arretiert diese je nach Signalklasse in einem charakteristischen Stadium der Entwicklung (Kaiser, 2004) (Abbildung 2).



**Abbildung 2: Interzelluläre Signale während des Entwicklungszyklus und der Morphogenese der multizellulären Fruchtkörper in *M. xanthus*.** Auf der Zeitachse werden durch die blauen Dreiecke die Zeitpunkte der Genexpression unabhängig vom C-Signal gekennzeichnet, während die orangenen Dreiecke die C-Signal-abhängige Genexpression anzeigen. Das Auftreten der einzelnen Signale wird durch die schwarzen bzw. orangenen Pfeile dargestellt (modifiziert nach Sogaard-Andersen *et al.*, 2003, Photos: Kuner & Kaiser, 1982).

Zwei Signale konnten auf biochemischer und funktioneller Ebene näher identifiziert werden: das lösliche A-Signal und das an der Zelloberfläche assoziierte C-Signal. Die weiteren Signale sind weder funktionell noch

biochemisch charakterisiert, man vermutet jedoch, dass sie in den frühen Stadien der Zellentwicklung eine Rolle spielen (Sogaard-Andersen *et al.*, 2003). Das A-Signalsystem dient als eine Art *quorum sensing* System und stellt sicher, dass der Entwicklungszyklus nicht initiiert wird, bevor eine ausreichend hohe Zelldichte der Bakterienpopulation vorliegt. Das C-Signalsystem garantiert die korrekte zeitliche und räumliche Abfolge der Aggregation, Fruchtkörperbildung und Sporulation durch eine Konzentrations-abhängige Signaltransduktion zwischen den beteiligten Zellen (Kim & Kaiser, 1991; Kruse *et al.*, 2001; Li *et al.*, 1992; Sogaard-Andersen *et al.*, 2003).

Eine erhöhte Konzentration des A-Signals induziert den Beginn des Entwicklungszyklus nach etwa 2 Stunden im Hungerzustand (Kuspa *et al.*, 1986). Das A-Signal setzt sich aus zwei verschiedenen Fraktionen zusammen: einer Hitze-stabilen und einer Hitze-instabilen Fraktion (Kaplan & Plamann, 1996). Während die Hitze-stabile Fraktion aus einer Mischung von Aminosäuren und Peptiden besteht, enthält die Hitze-instabile Fraktion mindestens zwei Proteasen. Diese Proteasen zeigen Ähnlichkeit zu Trypsin und sind wahrscheinlich an der Bildung der Aminosäuren und Peptide durch den Abbau von Oberflächenproteinen beteiligt (Plamann *et al.*, 1992). Es wurden sechs Mutanten (*asgA*, *asgB*, *asgC*, *asgD*, *asgE*, *sigD*) identifiziert, die ein Defizit in der A-Signalproduktion aufweisen. *asgA* und *asgD* kodieren für Histidinproteinkinasen und damit für Bestandteile eines Zwei-Komponenten-Systems (Cho & Zusman, 1999; Plamann *et al.*, 1995). *asgB* kodiert für ein DNA-Bindeprotein (Plamann *et al.*, 1994), *asgC* für den wichtigen vegetativen Sigmafaktor SigA in *M. xanthus* (Davis *et al.*, 1995) und das Genprodukt von *asgE* zeigt Sequenzähnlichkeiten zu einer Aminohydrolase (Garza *et al.*, 2000). Des Weiteren wurde *sigD* identifiziert, ein alternativer Sigmafaktor, der sowohl an der Produktion des A-Signals als auch an der zellulären Antwort beteiligt ist (Viswanathan *et al.*, 2006). Keines dieser Gene kodiert für eine Protease, so dass es bis heute nicht möglich war, die proteolytische Natur des A-Signals zu identifizieren. Da all diese Proteine jedoch an der Funktionalität des A-Signals beteiligt sind und Mutationen in jedem dieser Gene eine verminderte Produktion an extrazellulärem A-Signal zur Folge hat, wird angenommen, dass jedes einzelne Protein Teil eines gemeinsamen regulatorischen Signaltransduktions-

wegs sein könnte (Kaiser, 2004). Das derzeitige Modell zum A-Signalsystem besagt, dass in den ersten Stunden der Entwicklung eine Mixtur von Proteasen sekretiert wird, um Oberflächenproteine zu verdauen und dadurch Peptide und Aminosäuren zu generieren, die A-Signalaktivität aufweisen. Ab einer bestimmten Schwellenkonzentration wird die Expression von A-Signal-abhängigen Genen induziert und damit das Entwicklungsprogramm eingeleitet (Konovalova *et al.*, 2010; Plamann *et al.*, 1992).

### 3.5 Das C-Signal

Das C-Signal garantiert sechs Stunden nach Eintritt in die Hungerphase die korrekte zeitliche und räumliche Abfolge der Aggregation, Fruchtkörperbildung und Sporulation (Kroos & Kaiser, 1987). Die Synthese des C-Signals ist abhängig vom *csgA* Gen. *csgA* Mutanten sind nicht in der Lage zu aggregieren und zu sporulieren (Shimkets *et al.*, 1983), außerdem ist die Expression von CsgA-abhängigen Genen stark reduziert bzw. komplett ausgeschaltet (Kroos & Kaiser, 1987). Es konnte gezeigt werden, dass die Regulation von CsgA-abhängigen Prozessen konzentrationsabhängig ist (Kim & Kaiser, 1991; Kruse *et al.*, 2001; Li *et al.*, 1992). Während mittlere Konzentrationen des C-Signals für die Expression früher CsgA-abhängiger Gene und die Aggregation der Zellen erforderlich sind, werden hohe C-Signal-Konzentrationen für die Expression später CsgA-abhängiger Gene und für die Sporulation benötigt. Im Laufe der Entwicklung steigt die Konzentration des C-Signals sukzessiv an. Da die Übertragung des C-Signals Zellkontakt-abhängig ist, wird zusätzlich die räumliche Koordination der Fruchtkörperbildung gewährleistet (Kruse *et al.*, 2001). Das C-Signal fungiert letztlich als eine Art Zeitgeber für den Entwicklungsprozess, der in Abhängigkeit zur Zelldichte reguliert wird. Dazu wird zuerst die Aggregation eingeleitet, bevor beim Erreichen einer entsprechenden Zellmasse die Fruchtkörperbildung und die Sporulation folgen.

Das *csgA* Gen kodiert für ein 25 kDa großes Vorläuferprotein p25, welches durch die Subtilisin-ähnliche Serinprotease PopC prozessiert wird, indem der N-terminale Teil von p25 abgespalten wird (Kruse *et al.*, 2001; Lobedanz & Sogaard-Andersen, 2003; Rolbetzki *et al.*, 2008). Dadurch entsteht p17 mit einer Größe von 17 kDa (Kruse *et al.*, 2001; Lobedanz & Sogaard-

Andersen, 2003). In Immunoblot Analysen ist p25 nur in vegetativen Zellen nachweisbar, während p17 erst während der Hungerphase detektierbar ist. Beide Proteine akkumulieren im Laufe der Entwicklung (Kruse et al., 2001).

Es stellt sich die Frage, welches dieser beiden Proteine das C-Signal ist. Prinzipiell ist der gesamte Prozess der Entwicklung von Zell-Zell-Kontakten abhängig (Kim & Kaiser, 1990b). Der Entwicklungsdefekt von *csgA* Mutanten konnte durch die Zugabe von *M. xanthus* Zellfraktionen, die p17 enthalten, und durch die Zugabe von heterolog produziertem MalE-p25- bzw. MalE-p17.8-Fusionsprotein aufgehoben werden (Kim & Kaiser, 1991; Lee et al., 1995; Lobedanz & Sogaard-Andersen, 2003). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Antikörper gegen p17 die Entwicklung von *M. xanthus* inhibieren. Dies führte zu dem Schluss, dass die Antikörper an p25 bzw. p17 auf der Zelloberfläche binden und damit die Aktivität des C-Signals hemmen (Shimkets & Rafiee, 1990). In derselben Studie wurden Immunolokalisationsexperimente durchgeführt. Dazu wurden Wildtypzellen mit Antikörpern gefärbt, die spezifisch gegen ein Peptid gerichtet sind, das mit p17 übereinstimmt. Diese Primärantikörper wurden mit einem Immunogold-markierten Sekundärantikörper detektiert und über Transmissionselektronenmikroskopie analysiert. Dabei wurde p25 bzw. p17 auf der Zelloberfläche gefunden (Shimkets & Rafiee, 1990). Um die zelluläre Lokalisation von p25 und p17 in den verschiedenen Membranen der Gram-negativen Bakterien zu untersuchen, wurden Zellfraktionierungen durchgeführt (Lobedanz & Sogaard-Andersen, 2003). Dabei wurden verschiedene Fraktionen durch Triton X-100 Behandlung und Ultrazentrifugation voneinander getrennt und in eine Fraktion mit löslichem Protein, eine Fraktion mit angereicherter innerer Membran und eine Fraktion mit angereicherter äußerer Membran separiert (Lobedanz & Sogaard-Andersen, 2003). p25 als auch p17 konnten mittels Immunoblot Analyse in der Fraktion mit angereicherter äußerer Membran nachgewiesen werden. Diese Daten führten zu zwei möglichen Modellen. In dem einen Modell wird vermutet, dass p17 das aktive C-Signal ist. Dabei wird angenommen, dass p17 an einen vermuteten C-Signalrezeptor auf der Nachbarzelle bindet und dadurch den Entwicklungszyklus dieser Zelle initiiert (Lobedanz & Sogaard-Andersen, 2003). Dieses Modell wird dadurch gestützt, dass p17 eine signifikant höhere

C-Signalaktivität als p25 zeigt (Lobedanz & Sogaard-Andersen, 2003). p25 zeigt Sequenzhomologien mit Proteinen der Familie der kurzkettigen Alkoholdehydrogenasen (SCAD: *short-chain alcohol dehydrogenase*). Daher wurde in einem zweiten Model vermutet, dass p25 als Enzym fungieren könnte, welches das C-Signal generiert (Baker, 1994; Lee *et al.*, 1995). Die Mitglieder der SCAD-Familie sind intrazelluläre Enzyme, die  $\text{NAD}^+$  oder  $\text{NADP}^+$  dazu nutzen Reduktions- und Oxidationsreaktionen zu katalysieren. Diese Enzyme besitzen zwei konservierte Sequenzmotive, die ebenfalls in p25 zu finden sind. Am N-Terminus befindet sich eine konservierte  $\text{NAD(P)}^+$ -Bindestelle und weiter C-terminal ein konserviertes Motiv des katalytischen Zentrums (Lee *et al.*, 1995). Es konnte *in vitro* gezeigt werden, dass heterolog produziertes p25  $\text{NAD}^+$  bindet und dass die Coenzymbindung und C-Signalaktivität von p25 durch Mutationen in der  $\text{NAD(P)}^+$ -Bindestelle als auch im katalytischen Zentrum verloren gehen (Lee *et al.*, 1995). Die Coenzymbindestelle ist in p17 nach der Abspaltung des N-Terminus von p25 nicht mehr vorhanden (Lobedanz & Sogaard-Andersen, 2003). Daher basiert das aktuelle Modell auf der Annahme, dass p17 das C-Signal ist. Ob p25 als Enzym agiert, kann nicht ausgeschlossen werden.

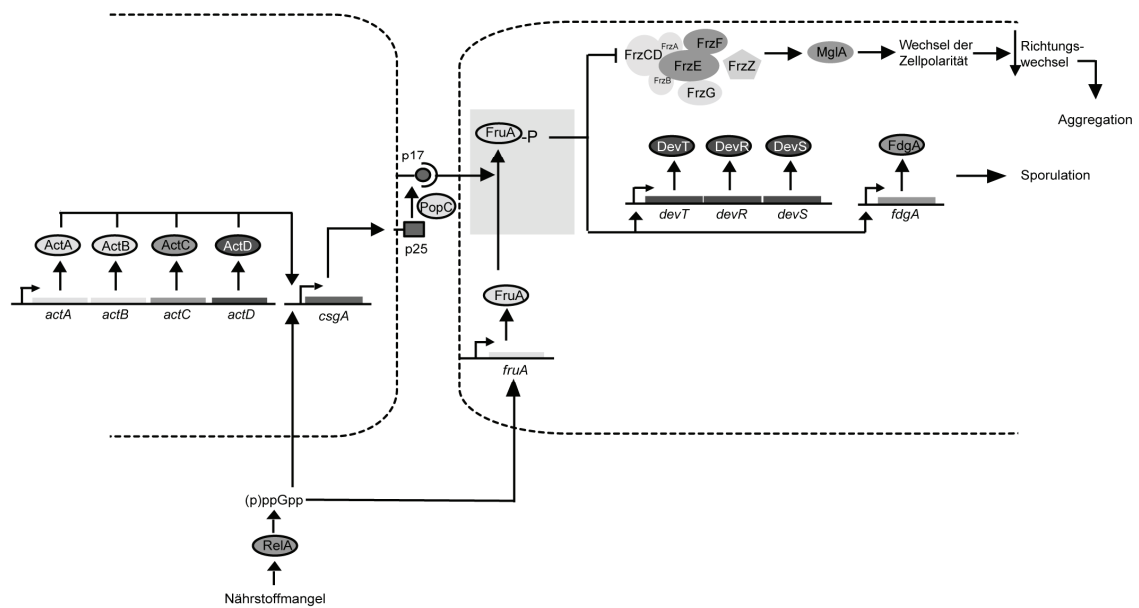
Durch Zellfraktionierungen konnten gezeigt werden, dass p25 und p17 mit der äußeren Membran assoziiert vorliegen (Lobedanz & Sogaard-Andersen, 2003). Ungeklärt ist bisher, wie p25 und p17 mit der äußeren Membran assoziiert sind. Die Aminosäuresequenz von p25 besitzt weder ein Signalpeptid für das Sec-System (Pugsley, 1993), noch eines für das Twin-Arginin-Translokations-System (Lobedanz & Sogaard-Andersen, 2003; Yen *et al.*, 2002). Außerdem zeigt die Modellstruktur von p25 keine typischen Charakteristika von Proteinen der äußeren Membran z.B. Transmembranregionen wie „ $\beta$ -barrel“ Strukturen. Mittels Triton X-114 Extraktion konnte gezeigt werden, dass p25 und p17 in der Detergenzphase nachweisbar sind, in der sich amphiphile Membranproteine und Lipoproteine anreichern (Lobedanz & Sogaard-Andersen, 2003). Dies führte zu der Vermutung, dass p25 über hydrophobe Modifikationen an der äußeren Membran verankert sein könnte (Lobedanz & Sogaard-Andersen, 2003). Zusätzlich wurde die Hypothese aufgestellt, dass der N-Terminus von p25 für

dessen Sekretion essentiell ist, da ein um den N-terminus verkürztes p25 Protein (Aminosäuren 60-229) *in vivo* nicht in der äußeren Membran, sondern im Zytoplasma detektiert wurde (Lobedanz & Sogaard-Andersen, 2003).

### 3.6 Der Entwicklungszyklus von *M. xanthus*

Abbildung 3 zeigt das aktuelle Modell für den C-Signaltransduktionsweg in zwei benachbarten *M. xanthus* Zellen. Der Entwicklungszyklus wird durch eine „stringente Antwort“ ausgelöst, bei der sich das chemische Signal (p)ppGpp durch die Aktivität der (p)ppGpp Synthase (RelA) anreichert (Harris *et al.*, 1998; Singer & Kaiser, 1995). Folglich wird der Nährstoffmangel durch den Anstieg der intrazellulären (p)ppGpp Konzentration messbar und initiiert so das A-Signalsystem (Kaiser, 2004; Manoil & Kaiser, 1980a; b). Durch das A-Signal wird eine ausreichend hohe Zelldichte gewährleistet (Plamann, 1999). Die Transkription des *csgA* Gens wird zum einen über RelA und zum anderen über die Proteine, für die das *actABCD* Operon kodiert, stimuliert (Gronewold & Kaiser, 2001). Ein weiteres essentielles Protein der C-Signaltransduktion ist der DNA-bindende *Response Regulator* FruA (Ellehaug *et al.*, 1998). Dieses Protein führt das A-Signal und das C-Signal in der Signaltransduktionskaskade zusammen. Die Aktivität von FruA wird von beiden Signalen kontrolliert. Zum einen induziert das A-Signal die Transkription des *fruA* Gens und führt so zu einer Anreicherung des FruA Proteins (Ellehaug *et al.*, 1998; Ogawa *et al.*, 1996). Zum anderen wird FruA durch das C-Signal aktiviert, indem es vermutlich durch eine bislang nicht identifizierte Histidinkinase phosphoryliert wird (Sogaard-Andersen, 2004). Die Konzentration an aktiviertem, phosphoryliertem FruA wiederum beeinflusst die weiteren Komponenten des Signalwegs. Dabei führt eine niedrige Konzentration an phosphoryliertem FruA zur Aggregation in den Anfängen der Entwicklung und eine hohe Konzentration zur späteren Sporulation (Kruse *et al.*, 2001).





**Abbildung 3: Modell des C-Signaltransduktionswegs.** Das Schema beschreibt die C-Signaltransduktion zwischen zwei benachbarten *M. xanthus* Zellen. Die Darstellung ist nur auf den C-Signalweg beschränkt. Eine detaillierte Beschreibung findet sich im Text. (modifiziert nach Huntley *et al.*, eingereicht)

Für die Aggregation spielt das *frz*-Operon eine entscheidende Rolle. Im Allgemeinen fungiert das *M. xanthus* Frz-System als zytoplasmatisches Signaltransduktionssystem, welches das Bewegungsmuster der Zellen kontrolliert (Zusman *et al.*, 2007). Im Speziellen dienen unter anderem FrzCD (zytoplasmatischer Chemorezeptor), FrzE (*Histidinkinase Response Regulator*) und FrzZ (*Response Regulator*) dazu, die Frequenz der zellulären Richtungswechsel in *M. xanthus* zu regulieren (Zusman *et al.*, 2007). Als nächstes Protein der Kaskade folgt das Ras-ähnliche G-protein MglA. Eine durch MglA vermittelte Veränderung der Zellpolarität in *M. xanthus* führt zum Richtungswechsel der Zellen (Leonardy *et al.*, 2010). Die Frequenz der zellulären Richtungswechsel in *M. xanthus* wird während der Entwicklung reduziert und die Zellen bewegen sich nunmehr in eine Richtung, um miteinander zu aggregieren und Zellhügel bilden zu können (Jelsbak & Sogaard-Andersen, 2002; Sogaard-Andersen & Kaiser, 1996). Dies führt wiederum zu einer höheren Zelldichte, durch die entstehenden Zellkontakte zu einem Anstieg der C-Signalkonzentration und resultiert letztlich in einer verstärkten Phosphorylierung von FruA. Hohe Konzentrationen des



phosphorylierten FruA Proteins aktivieren den zweiten Signalweg, der zur Sporulation über die Expression des *devTRS* Operon und des Gens *fdgA* führt (Ellehaug *et al.*, 1998; Viswanathan *et al.*, 2007). FdgA ist ein Lipoprotein der äußeren Membran, welches in den Export von Polysacchariden involviert ist (Ueki & Inouye, 2005). Zur Reifung der Myxosporen sind späte Sporulations-spezifische Gene notwendig, wie zum Beispiel  $\Omega$ 7536 (*exo*) (Licking *et al.*, 2000). Mit der Fertigstellung von widerstandsfähigen Sporen ist der Entwicklungsprozess abgeschlossen.

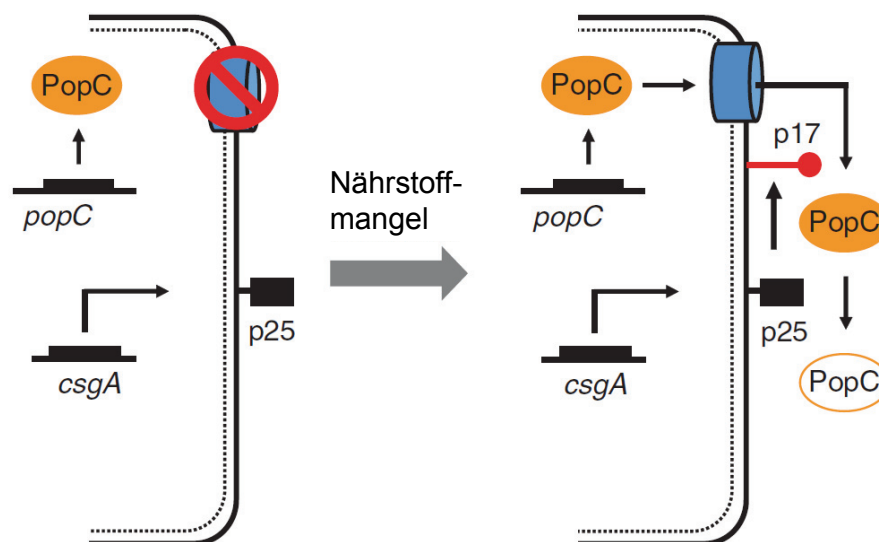
### 3.7 PopC

Die sekretierte Subtilisin-ähnliche Serinprotease PopC ist verantwortlich für die Spaltung des Vorläuferproteins p25 in das C-Signal p17 in *M. xanthus* (Rolbetzki *et al.*, 2008). Die folgenden Beobachtungen führten zu der Identifizierung von PopC und deren Klassifizierung als sekretierte Serinprotease: 1) der Extrakt von hungrigen *M. xanthus* Zellen kann das heterolog produzierte Fusionsprotein MalE-p25 in p17 spalten (Lobedanz & Sogaard-Andersen, 2003); 2) diese Spaltung wird durch die Zugabe des Serinproteaseinhibitors Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) unterbunden (Lobedanz & Sogaard-Andersen, 2003) und 3) p25 und p17 sind in der äußeren Membran und auf der Zelloberfläche von *M. xanthus* exponiert, sodass die Spaltung zu p17 auf der Zelloberfläche stattfinden muss (Kim & Kaiser, 1991; Lee *et al.*, 1995; Lobedanz & Sogaard-Andersen, 2003; Shimkets & Rafiee, 1990). Ein zusätzliches Kriterium war, dass die Transkription des Protease-kodierenden Gens während des Entwicklungszyklus hoch reguliert sein muss, da p17 erst in hungrigen Zellen nachweisbar ist und während der Entwicklung akkumuliert (Kruse *et al.*, 2001; Rolbetzki *et al.*, 2008). Letztendlich wurde das *popC* Gen identifiziert. Eine *popC* Mutante zeigte erwartungsgemäß einen vergleichbaren Phänotyp mit der *csgA* Mutante. Die *popC* Mutante war nicht im Stande Fruchtkörper zu bilden, die Sporulation war stark reduziert und in Immunoblot Analysen war nur p25, aber nicht p17, detektierbar (Rolbetzki *et al.*, 2008).

PopC besteht aus zwei verschiedenen Domänen. Am N-Terminus befindet sich eine Verlängerung aus 175 Aminosäuren, die keine Sequenz-

ähnlichkeiten zu bekannten Domänen zeigt. Am C-Terminus schließt die Peptidase S8-Domäne an, die die für Serinproteasen charakteristische katalytische Triade (Asp, His, Ser) enthält. Obwohl das Protein sekretiert wird, fehlt ein Signalpeptid (Rolbetzki, 2007; Rolbetzki *et al.*, 2008). Daher wird vermutet, dass PopC über spezielle Sekretionssysteme (Typ-I, -III, -IV oder -VI Sekretionssystem) aus der Zelle geschleust werden könnte (Rolbetzki *et al.*, 2008).

Bei der p25-Prozessierung unterliegt PopC einer „regulierten Proteolyse“, die auf der regulierten Sekretion von PopC basiert und es unmöglich macht, dass p17 vor Beginn eines Hungerzustands generiert wird (Abbildung 4).



**Abbildung 4: Modell der regulierten Sekretion von PopC.** In vegetativen Zellen akkumuliert p25 in der äußeren Membran und PopC im Zytoplasma. Bei Nährstoffmangel wird PopC über ein noch nicht identifiziertes Sekretionssystem (dargestellt in blau) aus der Zelle sekretiert und ist nun in der Lage p25 in p17 zu spalten. PopC wird auf der Zelloberfläche degradiert (Konovalova *et al.*, 2010).

Dabei befindet sich PopC in vegetativen Zellen im Zytoplasma und p25 ist auf der Zelloberfläche exponiert. PopC und p25 sind demnach räumlich voneinander getrennt. Folglich ist die Protease PopC nicht in der Lage das Substrat in p17 zu spalten. Erst nach Einsetzen des Hungerzustandes wird PopC auf die Zelloberfläche sekretiert, kommt in die räumliche Nähe von p25 und kann p17 generieren (Rolbetzki *et al.*, 2008). Auf der Zelloberfläche erfolgt

ein drastischer Abbau von PopC. Daher wird vermutet, dass PopC p25 nur in *cis* spalten kann, das bedeutet nur p25 an der PopC sekretierenden Zelle selbst (Rolbetzki *et al.*, 2008). Die regulierte Sekretion von PopC und sein schneller Abbau auf der Zelloberfläche führen zu der Hypothese, dass damit eine sukzessive Akkumulation von p17 gewährleistet wird. Damit soll die Konzentrations-abhängige, zeitliche und räumliche Koordination der Aggregation und Sporulation während der Entwicklung durch p17 ermöglicht werden (Konovalova *et al.*, 2010; Rolbetzki *et al.*, 2008).

### **3.8 Klassifizierung der Serinproteasen**

Proteasen können aufgrund ihres katalytischen Zentrums, ihrer funktionellen Eigenschaften und ihrer Abstammung eingeteilt werden. Derzeit unterscheidet man anhand der chemischen Beschaffenheit des katalytischen Zentrums sechs Klassen von Proteasen: Metallo-, Aspartat-, Cystein-, Glutamin-, Threonin- und Serinproteasen (Barrett *et al.*, 2003). Über 26000 Serinproteasen, die in der Natur in Eukaryoten, Bakterien, Archaea sowie Viren zu finden sind, werden in 40 Familien und 13 Stämme (*clans*) unterteilt (Page & Di Cera, 2008). Die Einteilung in Familien erfolgt aufgrund der gemeinsamen Abstammung, während die Klassifikation in Stämmen auf dem katalytischen Mechanismus der Proteasen beruht (Rawlings & Barrett, 1999). Die Familie der Subtilisin-ähnlichen Serinproteasen (Subtilasen; S8) zeigt eine hoch konservierte katalytische Domäne mit den für Serinproteasen typischen Aminosäuren Aspartat, Histidin und Serin (Blow, 1997; Hedstrom, 2002b). Dabei stellt das Serin die reaktive Gruppe in dieser katalytischen Triade dar, die für die Spaltung der Peptid-Bindung verantwortlich ist (Hedstrom, 2002a). Die Aminosäuren der katalytischen Triade werden von speziellen Sequenzmotiven umgeben, die grundlegend für die Einteilung in weitere Unterfamilien sind. Diese Unterfamilien sind zum einen die Subtilisin- (S8A) und zum anderen die Kexin- (S8B) Unterfamilie mit Subtilisin und Kexin als typische Vertreter.

### 3.9 Subtilisin-ähnliche Serinproteasen in anderen Organismen

In Eukaryoten, Bakterien, Archaea und Viren sind die Mitglieder der Subtilisin-Familie weit verbreitet und in viele verschiedene zelluläre Prozessen involviert (Hedstrom, 2002a). Dabei sind die meisten Vertreter aus niederen Eukaryoten, Bakterien und Archaea extrazelluläre, unspezifische Proteasen, die an der zellulären Abwehr und dem Wachstum beteiligt sind (Coutte *et al.*, 2001). Viele Pro-Hormone und andere sekretierte Proteine in Eukaryoten werden mittels Proteolyse durch sogenannte Pro-Protein Convertasen (PCs) aktiviert, die ebenfalls zu den Subtilisin-ähnlichen Proteasen (Unterfamilie S8B) gehören (Seidah *et al.*, 1998). Diese sind sehr spezifisch, wie zum Beispiel die Proteasen Kexin (Kex2) aus *Saccharomyces cerevisiae* oder Furin aus Säugern (Rockwell & Thorner, 2004; Roebroek *et al.*, 1986; Siezen & Leunissen, 1997). Diese Proteasen sind vorwiegend in sekretorischen Signaltransduktionswegen zu finden (Rockwell & Thorner, 2004). Kexin ist an verschiedenen proteolytischen Prozessen in *S. cerevisia* beteiligt, wie zum Beispiel an der Produktion des Reifungspheromons  $\alpha$ -Faktor ( *$\alpha$ -factor mating pheromone*) und des Killertoxins, welche durch intrazelluläre Spaltung ihrer Vorläuferproteine entstehen (Fuller *et al.*, 1989; Nakayama, 1997; Rockwell *et al.*, 2002). Furin hingegen ist eine Protease, die ubiquitär in menschlichen Gewebe verteilt zu finden ist (Rockwell *et al.*, 2002). Furin spaltet eine Vielzahl an Substraten und aktiviert diese dadurch. Diese Substrate sind z.B. Wachstumsfaktoren und Hormone, bakterielle Toxine, Zelloberflächenrezeptoren und virale Glykoproteine (Bresnahan *et al.*, 1990; Rockwell *et al.*, 2002).

Der Aufbau der Subtilasen ähnelt sich sehr. Die Mehrheit der Subtilasen werden als „Pro-Enzym“ synthetisiert (Siezen & Leunissen, 1997). Mit Hilfe eines N-terminalen Pro-Peptids (oder Signalpeptid) werden die inaktiven Proteasen über die Zellmembran transportiert (Siezen & Leunissen, 1997). Üblicherweise dient das Pro-Peptid als intramolekulares Chaperon zur Stabilisierung der Faltung der Protease und wird durch Autoproteolyse oder durch eine andere Protease entfernt, um die Protease zu aktivieren (Chen & Inouye, 2008). Auch in prokaryotischen Zellen sind viele Proteasen zu finden, die als Vorläuferprotein gebildet werden und zu der aktiven Protease prozessiert werden. Diese Prozessierung kann durch Autoproteolyse durch das

Protein selbst erfolgen, wie zum Beispiel bei SphB1 aus *Bordetella pertussis* (Coutte *et al.*, 2001; Mazar & Cotter, 2006). Es gibt aber auch Beispiele, bei denen keine Prozessierung und damit Aktivierung notwendig ist, wie bei AasP aus *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Ali *et al.*, 2008) oder PopC (Rolbetzki *et al.*, 2008). Die folgenden Beispiele zeigen Subtilasen auf, deren Funktionalität analog zu den Pro-Protein Convertasen ist, obwohl sie den zwei unterschiedlichen Unterfamilien S8A und S8B zuzuordnen sind.

Die sekretierte, spezifische Subtilisin-ähnliche Serinprotease SphB1 ist an der Prozessierung von Filamentösen Hämagglutinin (FHA) aus *B. pertussis* beteiligt, dem wichtigsten sekretierten Adhäsins dieses Organismus (Coutte *et al.*, 2001; Locht *et al.*, 1993; Mazar & Cotter, 2006). FHA wird gebildet, indem der C-Terminus des Vorläuferproteins FhaB abgespalten wird und das prozessierte Protein FHA nun dem N-Terminus von FhaB entspricht (Coutte *et al.*, 2001). Für diese Prozessierung ist der Autotransporter SphB1 verantwortlich, der wie PopC in die S8A-Unterfamilie einzuordnen ist. SphB1 verfügt im Gegensatz zu PopC über ein Signalpeptid, das für die Sekretion der Protease bedeutend ist (Coutte *et al.*, 2001) und konnte außerdem als Lipoprotein charakterisiert werden (Coutte *et al.*, 2003). Ein weiterer Unterschied zu PopC ist, dass sich SphB1 selbst prozessiert, wobei eine C-terminale  $\beta$ -Domäne entfernt wird (Coutte *et al.*, 2001). PopC zeigt keine Veränderung in seiner molekularen Masse im SDS-Gel und wird demnach nicht durch sich selbst oder generell prozessiert (Rolbetzki, 2007). PopC benötigt demnach keine Autoproteolyse, um aktiviert zu werden.

Ein weiteres Beispiel für Subtilisin-ähnliche Serinproteasen in Bakterien ist AasP aus *A. pleuropneumoniae*, einem Krankheitserreger bei Schweinen (Ali *et al.*, 2008). AasP ist, wie SphB1, der Superfamilie der äußeren Membran bzw. sekretierten Autotransportern in Gram-negativen Bakterien zuzuordnen (Ali *et al.*, 2008). AasP und SphB1 verfügen über ein Signalpeptid für den Transport auf die Zelloberfläche (Oldfield *et al.*, 2009). Im Unterschied zu SphB1, aber in Übereinstimmung mit PopC, wird AasP nicht proteolytisch gespalten, um aktiviert zu werden (Ali *et al.*, 2008). Das Substrat von AasP ist ein eisenreguliertes Lipoprotein OmlA, ein Protein der äußeren Membran, dessen Funktion nicht völlig aufgeklärt ist (Ali *et al.*, 2008).

PopC teilt viele Gemeinsamkeiten in seiner Funktionalität mit SphB1 und AasP. Diese drei Protease gehören zu derselben Unterfamilie der Subtilasen (S8A), wurden aus Gram-negativen Bakterien isoliert und sind an der Prozessierung von Proteinen auf der Zelloberfläche beteiligt.

### 3.10 Substratspezifität der Subtilisine

Um die Spaltmotive von Proteasen einheitlich benennen zu können, wurde eine spezielle Nomenklatur eingeführt (Schechter & Berger, 1967). Dabei wurde davon ausgegangen, dass die Protease die Sequenz um die Spaltstelle dadurch erkennt, dass Seitenketten von individuellen Aminosäuren des Substrats in passende Bindetaschen des Enzyms eingebracht werden (Schechter & Berger, 1967). Nach der Nomenklatur werden die Aminosäuren von der Spaltstelle ausgehend zum N-Terminus des Substrats hin mit  $P_1$ ,  $P_2$  usw. benannt (Abbildung 5). Im Enzym wird die entsprechende Bindestelle  $S_1$ ,  $S_2$  usw. bezeichnet. Aminosäuren auf der anderen Seite der Spaltstelle in Richtung des C-Terminus heißen  $P_1'$ ,  $P_2'$  usw. (entsprechend im Enzym:  $S_1'$ ,  $S_2'$  usw.).



**Abbildung 5: Nomenklatur von Spaltstellen in Proteasen nach Schechter & Berger, 1967.** Proteasen spalten das Substrat zwischen den Aminosäuren an den Positionen  $P_1$  und  $P_1'$  (dargestellt durch einen Pfeil). Eine detaillierte Erklärung findet sich im Text.

Alle Proteasen sind zu einem gewissen Maße Sequenz-spezifisch, wobei eine bis mehrere Aminosäuren an bestimmten Positionen um die Spaltstelle des Substrats herum bevorzugt werden (Turk, 2009). Die Binderegion einer Subtilase, z.B. bei Subtilisin BPN', ist im Allgemeinen ein oberflächlicher Kanal oder eine Spalte, die mindestens sechs Aminosäuren ( $P_4$ - $P_2'$ ) des Substrats aufnehmen kann (Siezen & Leunissen, 1997). Daher wird die Spezifität hauptsächlich durch die Interaktionen zwischen den  $P_4$ - $P_1$  Positionen des Enzyms und den entsprechenden  $S_4$ - $S_1$  des Substrats festgelegt und dabei speziell durch die  $S_1$ - $P_1$  Bindung definiert. Serinproteasen können sowohl Endo- als auch Exopeptidaseaktivität aufweisen (Hedstrom, 2002b). Dabei gibt

es spezifisch und unspezifisch spaltende Vertreter. Mitglieder der S8B-Unterfamilie, wie zum Beispiel Kexin und Furin, spalten spezifisch nach dibasischen Aminosäuren (Barr, 1991; Rawlings *et al.*, 2010). Eine hohe Spezifität für Arginin an Position P<sub>1</sub> ist dabei eine Gemeinsamkeit der meisten PCs, wobei für Furin die P<sub>4</sub> Position zusätzlich von entscheidender Bedeutung ist (Rockwell & Thorner, 2004). Für Kexin ist neben der P<sub>1</sub> Position ein Lysin oder Arginin an P<sub>2</sub> essentieller als die P<sub>4</sub> Position (Rockwell & Thorner, 2004) (Abbildung 6).

Subtilisin (Substrat)	Spaltnmotiv	Konsensus-Sequenz	Ref
<b>S8B:</b>	P <sub>4</sub> P <sub>2</sub> P <sub>1</sub> ↓ P <sub>1</sub> '	P <sub>4</sub> P <sub>3</sub> P <sub>2</sub> P <sub>1</sub> ↓ P <sub>1</sub> '	
Kexin (MFα1 pro-α-factor; 104↓105)	---MYKR EA	R/K -R↓	1,4
Furin (Diphtheria Toxin)	AGNRVRR SV	R -x- R/K -R↓	2,3
<b>S8A:</b>	P <sub>4</sub> P <sub>2</sub> P <sub>1</sub> ↓ P <sub>1</sub> '	P <sub>4</sub> P <sub>3</sub> P <sub>2</sub> P <sub>1</sub> ↓ P <sub>1</sub> '	
AasP (OmlA Peptide)	KELGVK DI	K↓DI	5
SKI-1/S1P (GP Lassa) *	RRLG GT	R/K-x-V/I/L-Z↓	6,7
SphB1 (FhaB) * *	PLFETRIKFID	PLFETRIKFID	8

**Abbildung 6: Übersicht der Spaltnotive verschiedener Subtilasen.** Vertreter der Subtilisin-Unterfamilien S8A und S8B, die im Text erwähnt werden, mit Spaltnativen und Konsensus-Sequenzen. Die Spaltstellen werden durch die Pfeile angezeigt. \* Z = jede Aminosäure, außer V, P, E, C. \*\* Spaltnativ innerhalb dieser Sequenz, weggestrichene Aminosäuren in der Konsensus-Sequenz sind nicht für Spaltprozess essentiell. (Referenzen: 1 (Rockwell & Fuller, 1998); 2 (Tsuneoka *et al.*, 1993); 3 (Hosaka *et al.*, 1991); 4 (Rawlings *et al.*, 2010); 5 (Ali *et al.*, 2008); 6 (Lenz *et al.*, 2000); 7 (Seidah *et al.*, 2006); 8 (Coutte *et al.*, 2001)).

Bei der Unterfamilie S8A handelt es sich vorwiegend um unspezifische Proteasen mit einer Präferenz zur Spaltung nach hydrophoben Aminosäurenresten an der P<sub>1</sub> Position (Rawlings *et al.*, 2010). Beispiele für unspezifische Serinproteasen sind dabei Subtilisin Carlsberg aus *Bacillus licheniformis*. Diese Protease ist der erster Vertreter von Proteasen, die in Waschmitteln verwendet wurden (Saeki *et al.*, 2007). Doch es gibt auch Beispiele für spezifische S8A-Vertreter, wie die PopC Protease aus *M. xanthus* (Rolbetzki *et al.*, 2008), den SphB1 Autotransporter aus *B. pertussis* (Coutte *et al.*, 2001) oder AasP aus *A. pleuropneumoniae* (Ali *et al.*, 2008). Über die exakte Spaltstelle von SphB1 in FhaB ist bekannt, dass die Aminosäuresequenz, die die Spaltstelle in FhaB enthalten soll, dem Motiv <sup>2292</sup>PLFETRIKFID<sup>2302</sup> entspricht, wobei die Aminosäuren E,R,K und D nicht für den Spaltprozess essentiell sein sollen (Coutte *et al.*, 2001; Mazar & Cotter, 2006). Die Spaltstelle des Autotransporters AasP aus *A. pleuropneumoniae*



liegt nach der Analyse von OmlA Peptiden durch Massenspektrometrie vor der Aminosäure Aspartat 133 in der Sequenz KELGVKD<sup>133</sup>INSG (Ali *et al.*, 2008). Dieses muss allerdings durch weitere Experimente, z.B. durch Alaninsubstitutionen der relevanten Aminosäuren, bestätigt werden. Insgesamt ist wenig bekannt über die Spaltmotive spezifisch spaltender Subtilisine der S8A Unterfamilie in Bakterien. Die humane Subtilisin Kexin Isoenzyme-1/ Site 1 Protease (SKI-1/S1P) ist eine ubiquitär exprimierte S8A-Serinprotease, die unter anderem an der Spaltung des Glykoproteins des Lassa-virus beteiligt ist. Dabei spaltet sie dieses Glykoprotein im spezifischen Aminosäuremotiv RRLL<sup>259</sup>GTF nach Leucin 259 (Lenz *et al.*, 2000). Dieses Spaltmotiv stimmt mit dem Konsensus-Spaltmotiv von Furin in der Hinsicht überein, dass an der P<sub>4</sub> Position ein Arginin essentiell und die Aminosäure an der P<sub>3</sub> Position variabel ist (Lenz *et al.*, 2000). Im Gegensatz zu Furin, welches eine Präferenz zur Spaltung nach basischen Aminosäuren hat, befindet sich bei der Spaltung des Lassa-Glykoproteins ein Leucin an der P<sub>1</sub> Position (Lenz *et al.*, 2000). Die Konsensus-Sequenz für SKI-1/S1P wurde daraufhin erweitert zu: (R/K)X(L, I, V)-Z, wobei Z für jede Aminosäure steht, außer für Valin, Prolin, Glutamat oder Cystein (Seidah & Prat, 2002; Seidah *et al.*, 2006).

### 3.11 Ziele dieser Arbeit

In dieser Arbeit sollen folgende offene Fragen zum C-Signal p17 beantwortet werden. Zum einen stellt sich nach der Detektion von p25 und p17 in der äußeren Zellmembran (Lobedanz & Sogaard-Andersen, 2003) die Frage nach der Lokalisation von p25 auf der Zelloberfläche. Es wird vermutet, dass p17 auf der Zelloberfläche exponiert ist. Für die Orientierung von p25 sind zwei Modelle denkbar. Zum einen könnte p25 ins Periplasma gerichtet sein oder zum anderen auf der Zelloberfläche exponiert sein. Um diese Fragestellung zu beantworten, wurden *Cell shaving* Experimente durchgeführt.

Zum anderen ist die Spaltstelle von PopC in p25 unbekannt. Daher ist die Identifizierung dieser PopC-Spaltstelle die zweite zu beantwortende Frage. Mit Hilfe biochemischer und genetischer Strategien sollte die PopC-Spaltstelle bestimmt werden. Dazu wurden massenspektrometrische Analysen von p17 zur Aufklärung der PopC-Spaltstelle durchgeführt. Außerdem wurden synthetische



Peptide und MalE-p25 Deletionsderivate sowie Alaninsubstitutionsmutanten, die sowohl *in vitro* als auch *in vivo* analysiert wurden, verwendet. Ist eine Aminosäure letztlich in der Spaltstelle von PopC für die Prozessierung von p25 essentiell, sollte PopC nicht mehr in der Lage sein, p17 zu generieren. Demzufolge wäre die C-Signaltransduktion unterbunden und der Entwicklungszyklus kann nicht ablaufen. Während der Entwicklung wurde deshalb ein Phänotyp erwartet, der dem einer *csgA* Mutante entspricht. Die Mutante sollte geringe bis gar keine Aggregation, keine Fruchtkörperbildung und keine Sporulation zeigen. Zudem sollte während der Entwicklung nur p25, aber kein p17 auf Protein-Ebene in Analysen mittels Immunoblot detektierbar sein.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Material und Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien und Antibiotika wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen), Fluka (Buchs, Schweiz), Difco (Heidelberg) und Invitrogen (Karlsruhe) bezogen. Zur Reinigung von PCR-Produkten und für die DNA-Isolierung aus Agarosegelen wurden folgende Kit-Systeme der Firma Zymo Research (HiSS-Diagnostics, Freiburg) benutzt: „Zymoclean™ Gel DNA Recovery“, „DNA Clean & Concentrator™-5“. Die verwendeten DNA-Marker „HyperLadder™“ stammten von der Firma Bioline (Luckenwalde), die verwendeten Proteinmarker („PageRuler™ Prestained Protein Ladder“, „Page-Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder“, „Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder“) von der Firma Fermentas (St. Leon-Rot). Synthetische Oligonukleotide wurden von Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen) und Invitrogen (Karlsruhe) hergestellt. Die DNA-Sequenzierung wurde zunächst mit dem „3130 Genetic Analyser“ von Applied Biosystems im Max-Planck-Institut in der Abteilung Ökophysiologie in Marburg durchgeführt und später von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) übernommen.

#### 4.1.1 Enzyme

Restriktionsendonukleasen stammten von New England Biolabs (Frankfurt a.M.) und Fermentas (St. Leon-Rot). Zusätzlich wurden die Antarctic Phosphatase® von New England Biolabs (Frankfurt a.M.) und das „Rapid DNA Ligation Kit“ von Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen. Die verwendeten DNA-Polymerasen waren die *PfuUltra™II* Polymerase von der Firma Stratagene (Amsterdam) und der 5 PRIME MasterMix der Firma 5 PRIME GmbH (Hamburg). Weitere Enzyme waren den jeweiligen Kits beigelegt.

#### 4.1.2 Verwendete Geräte

In dieser Arbeit überwiegend verwendeten Geräte:

**Tabelle 1: Geräte**

Geräte	Typ	Hersteller
Zentrifugen	SORVALL RC 5B plus SORVALL–Ultra Pro 80 Multifuge 1 s-R Biofuge fresco Biofuge pico	Thermo Electron (Dreieich)
PCR-Maschinen	Mastercycler personal Mastercycler epgradient	Eppendorf (Hamburg)
Thermomixer	Thermomix compact	Eppendorf (Hamburg)
Agarosegel-Photographie	2UV-Transilluminator	UVP BioDoc-It-System (USA)
UV-Tisch	UVT_20 LE	Herolab (Wiesloch)
Ultraschall	Branson Sonifier 250	G. Heinemann (Schwäbisch Gmünd)
SDS-PAGE Apparatur	Mini-Protean 3 Cell	Bio-Rad (München)
Spektral-Nanodrop	Nanodrop ND-1000	Nanodrop (Wilmington, USA)
Spektral-Photometer	Ultrospec 2100 pro	Amersham Biociences (Freiburg)
Elektroporation	Gene Pulser Xcell	Bio-Rad (München)
Fuji-Imager Chemilumineszenzdetektion	Luminescent Image Analyser LAS~4000“	Fujifilm (Düsseldorf)
Immunoblot Analyse	SNAP i.d. Protein detection system	Millipore (Schwalbach/Ts.)
MALDI-TOF	4800Plus MALDI- TOF/TOF mass spectrometer	Applied Biosystems (Darmstadt)

#### 4.1.3 Medien

Die Medien für *Escherichia coli* wurden wie beschrieben hergestellt (Sambrook *et al.*, 1989). Die Kultivierung der verwendeten Stämme zur Gewinnung von Plasmiden erfolgte aerob auf LB-Medium, während das SOC-Medium bei der Transformation von *E. coli* Verwendung fand (Tabelle 2).

**Tabelle 2: Nährmedien für *E. coli***

Medium	Zusammensetzung (pro Liter)
LB ( <u>L</u> ysogeny <u>B</u> roth)	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl
LB-Agarplatten	LB-Medium 15 g Agar
SOC ( <u>S</u> uper <u>O</u> ptimal Broth With <u>C</u> atabolite Repression)	20 g Trypton 5 g Hefeextrakt 0,5 g NaCl 2,5 ml 1 M KCl 10 ml 1 M MgCl <sub>2</sub> 20 ml 1 M Glukose pH 7,0  MgCl <sub>2</sub> und Glukose wurden nach dem Autoklavieren steril zugeben

Wurde das LB-Medium als Selektionsmedium verwendet, wurden entsprechende Antibiotika zugefügt (Tabelle 3).

**Tabelle 3: Zusätze**

Zusatz	Endkonzentration	gelöst in
Ampicillin-Natriumsalz	100 µg/ml	H <sub>2</sub> O
Chloramphenicol	50 µg/ml	100% Ethanol
Gentamycinsulfat	10 µg/ml	H <sub>2</sub> O
Kanamycinsulfat	100 µg/ml	H <sub>2</sub> O
Oxytetracyklin-Dihydrat	10 µg/ml	0,1 M HCl
X-Gal	40 µg/ml	DMF

Die Kultivierung von *M. xanthus* erfolgte auf 1% CTT-Medium unter Zugabe einer Spurenelementlösung (Tabelle 4). Da der Wildtypstamm DK1622 eine natürliche Resistenz gegenüber Gentamycin trägt, wurde dieses Antibiotikum zum Schutz vor Kontamination verwendet. Für die Entwicklungsstudien von *M. xanthus* wurden spezielle Medien benötigt (Tabelle 5).

**Tabelle 4: Nährmedien und Zusätze für *M. xanthus***

Medium	Zusammensetzung (pro Liter)
1% CTT	10 g Casiton 10 ml 1 M Tris-HCl, pH 8,0 1 ml 1 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,6 10 ml 0,8 M MgSO <sub>4</sub> 1 ml Spurenelementlösung (1000 x)
1% CTT-Agarplatten	1% CTT-Medium 15 g Agar
CTT-Soft-Agar	1% CTT-Medium 7,5 g Agar
CTTYE	1% CTT-Medium 2 g Hefeextrakt
Spurenelementlösung (1000 x)	15 g Titriplex III 136 mg ZnCl <sub>2</sub> 250 mg CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O 238 mg CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O 200 mg Na <sub>2</sub> Mo <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 200 mg MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O 2,8 g FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O pH 7,0

**Tabelle 5: Medien für Entwicklungsstudien von *M. xanthus***

Medium	Zusammensetzung (pro Liter)
TPM-Agarplatten (Kuner & Kaiser, 1982) 24 Stunden vor Gebrauch vorbereiten	15 g Agar 10 ml 1 M Tris-HCl, pH 7,6 1 ml 1 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,6 10 ml 0,8 M MgSO <sub>4</sub>
MC7-Puffer für <i>Submerged</i> -Kultur	10 ml 1 M MOPS, pH 7,0 1 ml 1 M CaCl <sub>2</sub>

## 4.2 Mikrobiologische Methoden

### 4.2.1 Vektoren, Plasmide und Bakterienstämme

In dieser Arbeit wurden verschiedene Vektoren und Plasmide verwendet, die in Tabelle 6 zusammengefasst sind. Die verwendeten Stämme von *E. coli* und *M. xanthus* sind in den Tabellen 7 und 8 aufgeführt.

**Tabelle 6: Vektoren und Plasmide**

Bezeichnung	Genotyp / Beschreibung	Referenz
pSWU19	pBGS18 (Spratt et al., 1986) Derivat, Mx8 <i>attP</i> , Km <sup>R</sup>	(Wu & Kaiser, 1995)
pSW144	<i>SacI</i> - <i>PcsgA</i> - <i>XbaI</i> (1 kb <i>upstream</i> von <i>csgA</i> ; Promotor-Region) in pSWU19	(Weis, 2007)
pBul80	<i>csgA</i> in pMAL-c2x	(Lee et al., 1995)
pAB-27	His <sub>6</sub> -PopC in pET-24b(+)	(Rolbetzki, 2007)
pAB-36	His <sub>6</sub> -PopC <sup>S423A</sup> in pET-24b(+)	(Rolbetzki, 2007)
pMalE-p16.5	<i>csgA</i> (76-229) in pMAL-c2x	diese Arbeit
pMalE-p16.7	<i>csgA</i> (73-229) in pMAL-c2x	diese Arbeit
pMalE-p16.9	<i>csgA</i> (71-229) in pMAL-c2x	diese Arbeit
pMalE-p17.2	<i>csgA</i> (69-229) in pMAL-c2x	diese Arbeit
pMalE-p17.4	<i>csgA</i> (67-229) in pMAL-c2x	diese Arbeit
pMalE-p17.6	<i>csgA</i> (65-229) in pMAL-c2x	diese Arbeit
pMalE-p17.8	<i>csgA</i> (63-229) in pMAL-c2x	diese Arbeit
pMalE-p18.4	<i>csgA</i> (58-229) in pMAL-c2x	diese Arbeit
pMalE-p18.6	<i>csgA</i> (56-229) in pMAL-c2x	diese Arbeit
pMalE- <i>csgA</i> -Strep	MalE- <i>csgA</i> -Strep	diese Arbeit
pMalE-p25 <sup>R50A</sup>	<i>csgA</i> mit Punktmutation R50A in MalE- <i>csgA</i> -Strep	diese Arbeit
pMalE-p25 <sup>L51A</sup>	<i>csgA</i> mit Punktmutation L51A in MalE- <i>csgA</i> -Strep	diese Arbeit
pMalE-p25 <sup>R52A</sup>	<i>csgA</i> mit Punktmutation R52A in MalE- <i>csgA</i> -Strep	diese Arbeit
pMalE-p25 <sup>I53A</sup>	<i>csgA</i> mit Punktmutation I53A in MalE- <i>csgA</i> -Strep	diese Arbeit
pMalE-p25 <sup>H54A</sup>	<i>csgA</i> mit Punktmutation H54A in MalE- <i>csgA</i> -Strep	diese Arbeit
pMalE-p25 <sup>L56A</sup>	<i>csgA</i> mit Punktmutation L56A in MalE- <i>csgA</i> -Strep	diese Arbeit

Bezeichnung	Genotyp / Beschreibung	Referenz
pMalE-p25 <sup>D57A</sup>	<i>csgA</i> mit Punktmutation D57A in MalE- <i>csgA</i> -Strep	diese Arbeit
pMalE-p25 <sup>V58A</sup>	<i>csgA</i> mit Punktmutation V58A in MalE- <i>csgA</i> -Strep	diese Arbeit
pMalE-p25 <sup>G59A</sup>	<i>csgA</i> mit Punktmutation G59A in MalE- <i>csgA</i> -Strep	diese Arbeit
pMalE-p25 <sup>D60A</sup>	<i>csgA</i> mit Punktmutation D60A in MalE- <i>csgA</i> -Strep	diese Arbeit
pMalE-p25 <sup>D61A</sup>	<i>csgA</i> mit Punktmutation D61A in MalE- <i>csgA</i> -Strep	diese Arbeit
pMalE-p25 <sup>D62A</sup>	<i>csgA</i> mit Punktmutation D62A in MalE- <i>csgA</i> -Strep	diese Arbeit
pMalE-p25 <sup>S63A</sup>	<i>csgA</i> mit Punktmutation S63A in MalE- <i>csgA</i> -Strep	diese Arbeit
pMalE-p25 <sup>R65A</sup>	<i>csgA</i> mit Punktmutation R65A in MalE- <i>csgA</i> -Strep	diese Arbeit
pMalE-p25 <sup>F67A</sup>	<i>csgA</i> mit Punktmutation F67A in MalE- <i>csgA</i> -Strep	diese Arbeit
pMalE-p25 <sup>T69A</sup>	<i>csgA</i> mit Punktmutation T69A in MalE- <i>csgA</i> -Strep	diese Arbeit
pMA15neu	<i>SacI</i> -1kb <i>upstream</i> von <i>csgA</i> + <i>csgA</i> - <i>HindIII</i> in pSWU19	diese Arbeit
p25 <sup>R50A</sup>	<i>csgA</i> mit Punktmutation R50A in pMA15neu	diese Arbeit
p25 <sup>L51A</sup>	<i>csgA</i> mit Punktmutation L51A in pMA15neu	diese Arbeit
p25 <sup>R52A</sup>	<i>csgA</i> mit Punktmutation R52A in pMA15neu	diese Arbeit
p25 <sup>I53A</sup>	<i>csgA</i> mit Punktmutation I53A in pMA15neu	diese Arbeit
p25 <sup>H54A</sup>	<i>csgA</i> mit Punktmutation H54A in pMA15neu	diese Arbeit
p25 <sup>L56A</sup>	<i>csgA</i> mit Punktmutation L56A in pMA15neu	diese Arbeit
p25 <sup>D57A</sup>	<i>csgA</i> mit Punktmutation D57A in pMA15neu	diese Arbeit
p25 <sup>V58A</sup>	<i>csgA</i> mit Punktmutation V58A in pMA15neu	diese Arbeit
p25 <sup>G59A</sup>	<i>csgA</i> mit Punktmutation G59A in pMA15neu	diese Arbeit
p25 <sup>D60A</sup>	<i>csgA</i> mit Punktmutation D60A in pMA15neu	diese Arbeit

**Tabelle 7: Verwendete *E. coli* Stämme**

Stämme <i>E. coli</i>	Genotyp	Referenz
TOP10	<i>F<sup>-</sup> mcrA Δ(mrr-hsdRMS mcrBC), 80lacZ ΔM15 ΔlacX74, recA1, deoR, araD139 Δ(ara-leu) 7697, galU, galK, rpsL strR) endA1, nupG</i>	Invitrogen (Karlsruhe)
BL21 (DE3)	<i>F<sup>-</sup> ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub>-m<sub>B</sub>) gal dcm(DE3)</i>	Novagen/Merck (Darmstadt)
Rosetta™ 2(DE3)	<i>F<sup>-</sup> ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub>-m<sub>B</sub>) gal dcm(DE3) pRARE2(Cm<sup>R</sup>)</i>	Novagen/Merck (Darmstadt)
XL10-Gold ultracompetent	<i>TetR Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr) 173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F<sup>+</sup> proAB lacIqZΔM15 Tn10 (TetR) Amy Cam<sup>R</sup>]</i>	Stratagene (Amsterdam)
MalE-p25 (pBul80)	<i>csgA</i> in pMAL-c2x in <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	(Lee <i>et al.</i> , 1995)
MalE-p25 (pBul80)	<i>csgA</i> in pMAL-c2x in <i>E. coli</i> Rosetta™ 2(DE3)	diese Arbeit
AB-27	pAB-27 ( <i>popC</i> <sup>WT</sup> in pET-24b(+)) in <i>E. coli</i> Rosetta 2(DE3)	(Rolbetzki, 2007)
AB-36	pAB-36 ( <i>popC</i> <sup>S423A</sup> in pET-24b(+)) in <i>E. coli</i> Rosetta 2(DE3)	(Rolbetzki, 2007)
MalE-p16.5	MalE-p16.5 in <i>E. coli</i> Rosetta 2(DE3)	diese Arbeit
MalE-p16.7	MalE-p16.7 in <i>E. coli</i> Rosetta 2(DE3)	diese Arbeit
MalE-p16.9	MalE-p16.9 in <i>E. coli</i> Rosetta 2(DE3)	diese Arbeit
MalE-p17.2	MalE-p17.2 in <i>E. coli</i> Rosetta 2(DE3)	diese Arbeit
MalE-p17.4	MalE-p17.4 in <i>E. coli</i> Rosetta 2(DE3)	diese Arbeit
MalE-p17.6	MalE-p17.6 in <i>E. coli</i> Rosetta 2(DE3)	diese Arbeit
MalE-p17.8	MalE-p17.8 in <i>E. coli</i> Rosetta 2(DE3)	diese Arbeit
MalE-p18.4	MalE-p18.4 in <i>E. coli</i> Rosetta 2(DE3)	diese Arbeit
MalE-p18.6	MalE-p18.6 in <i>E. coli</i> Rosetta 2(DE3)	diese Arbeit
MalE-csgA-Strep	MalE-csgA-Strep in <i>E. coli</i> Rosetta 2(DE3)	diese Arbeit
MalE-p25 <sup>R50A</sup>	MalE-p25 <sup>R50A</sup> in <i>E. coli</i> Rosetta 2(DE3)	diese Arbeit
MalE-p25 <sup>L51A</sup>	MalE-p25 <sup>L51A</sup> in <i>E. coli</i> Rosetta 2(DE3)	diese Arbeit
MalE-p25 <sup>R52A</sup>	MalE-p25 <sup>R52A</sup> in <i>E. coli</i> Rosetta 2(DE3)	diese Arbeit
MalE-p25 <sup>I53A</sup>	MalE-p25 <sup>I53A</sup> in <i>E. coli</i> Rosetta 2(DE3)	diese Arbeit
MalE-p25 <sup>H54A</sup>	MalE-p25 <sup>H54A</sup> in <i>E. coli</i> Rosetta 2(DE3)	diese Arbeit
MalE-p25 <sup>L56A</sup>	MalE-p25 <sup>L56A</sup> in <i>E. coli</i> Rosetta 2(DE3)	diese Arbeit
MalE-p25 <sup>D57A</sup>	MalE-p25 <sup>D57A</sup> in <i>E. coli</i> Rosetta 2(DE3)	diese Arbeit



Stämme <i>E. coli</i>	Genotyp	Referenz
MalE-p25 <sup>V58A</sup>	MalE-p25 <sup>V58A</sup> in <i>E. coli</i> Rosetta 2(DE3)	diese Arbeit
MalE-p25 <sup>G59A</sup>	MalE-p25 <sup>G59A</sup> in <i>E. coli</i> Rosetta 2(DE3)	diese Arbeit
MalE-p25 <sup>D60A</sup>	MalE-p25 <sup>D60A</sup> in <i>E. coli</i> Rosetta 2(DE3)	diese Arbeit
MalE-p25 <sup>D61A</sup>	MalE-p25 <sup>D61A</sup> in <i>E. coli</i> Rosetta 2(DE3)	diese Arbeit
MalE-p25 <sup>D62A</sup>	MalE-p25 <sup>D62A</sup> in <i>E. coli</i> Rosetta 2(DE3)	diese Arbeit
MalE-p25 <sup>S63A</sup>	MalE-p25 <sup>S63A</sup> in <i>E. coli</i> Rosetta 2(DE3)	diese Arbeit
MalE-p25 <sup>R65A</sup>	MalE-p25 <sup>R65A</sup> in <i>E. coli</i> Rosetta 2(DE3)	diese Arbeit
MalE-p25 <sup>F67A</sup>	MalE-p25 <sup>F67A</sup> in <i>E. coli</i> Rosetta 2(DE3)	diese Arbeit
MalE-p25 <sup>T69A</sup>	MalE-p25 <sup>T69A</sup> in <i>E. coli</i> Rosetta 2(DE3)	diese Arbeit

Tabelle 8: Verwendete *M. xanthus* Stämme

Stämme <i>M. xanthus</i>	Genotyp	Referenz
DK1622	Wildtyp	(Kaiser, 1979)
DK5208	<i>csgA</i> ::Tn5-132 $\Omega$ LS205	(Kroos & Kaiser, 1987)
SA1098	<i>attB</i> ::pTK98-10 (zusätzliche Kopien von <i>csgA</i> )	(Kruse <i>et al.</i> , 2001)
DK10417	$\Delta pilC$	(Wu <i>et al.</i> , 1997)
DK8615	$\Delta pilQ$	(Wall <i>et al.</i> , 1999)
DK10405	$\Delta tgl$ ::Tc	(Wall <i>et al.</i> , 1998)
SA2314	<i>popC</i> ::pAB3 ( <i>popC</i> <sup>-</sup> )	(Rolbetzki, 2007)
SA2327	<i>popC</i> ::pAB3/pAB25 ( <i>popC</i> <sup>+</sup> )	(Rolbetzki, 2007)
SA2329	<i>popC</i> ::pAB3/pAB26 ( <i>popC</i> <sup>S423A</sup> )	(Rolbetzki, 2007)
SA3601	DK5208, <i>attB</i> ::p25 (pMA15neu) Km <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup>	diese Arbeit
SA3607	DK5208, <i>attB</i> ::p25 <sup>I53A</sup> , Km <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup>	diese Arbeit
SA3608	DK5208, <i>attB</i> ::p25 <sup>H54A</sup> , Km <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup>	diese Arbeit
SA3609	DK5208, <i>attB</i> ::p25 <sup>R50A</sup> , Km <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup>	diese Arbeit
SA3610	DK5208, <i>attB</i> ::p25 <sup>L56A</sup> , Km <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup>	diese Arbeit
SA3611	DK5208, <i>attB</i> ::p25 <sup>D57A</sup> , Km <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup>	diese Arbeit
SA3613	DK5208, <i>attB</i> ::p25 <sup>L51A</sup> , Km <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup>	diese Arbeit
SA3614	DK5208, <i>attB</i> ::p25 <sup>V58A</sup> , Km <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup>	diese Arbeit
SA3615	DK5208, <i>attB</i> ::p25 <sup>D60A</sup> , Km <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup>	diese Arbeit
SA3616	DK5208, <i>attB</i> ::p25 <sup>R52A</sup> , Km <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup>	diese Arbeit

#### 4.2.2 Herstellung der Plasmidkonstrukte

Im Folgenden werden die Klonierungsstrategien der verwendeten Plasmide anhand von Beispielen beschrieben. Die genannten Oligonukleotide sind in Tabelle 9 aufgeführt.

MalE-p17.8: Zur Herstellung von MalE-p17.8 wurde eine PCR mit den Oligonukleotiden oMA023 und oMA022 durchgeführt, die das verkürzte Gen *csgA* amplifizieren. Dieses PCR-Produkt wurde mit dem Restriktionsenzym *Bsal/Eco31I* verdaut und anschließend wurde das *Klenow*-Fragment dazu verwendet, die 5'-überstehenden, einzelsträngigen DNA-Sequenzen aufzufüllen. Nach der Reinigung des PCR-Produktes wurde es mit *HindIII* geschnitten und in den Zielvektor pMAL-c2x ligiert, der mit den Restriktionsenzymen *XmnI* und *HindIII* geöffnet und zuvor dephosphoryliert wurde, wodurch das Plasmid MalE-p17.8 entsteht. Das Plasmid wurde durch Sequenzierung mit den Oligonukleotiden oNH237 und oMA011 auf Richtigkeit des integrierten Gens überprüft. Die Plasmide MalE-p16.5-MalE-p18.6 wurden nach diesem angegebenen Beispiel konstruiert.

pMalE-csgA-Strep: Zur Herstellung von pMalE-csgA-Strep wurde eine PCR mit den Oligonukleotiden oMA021 und oMA030 durchgeführt, um das *csgA* Gene zu amplifizieren und mit dem oMA030-Primer einen Strep-tag am 3'Ende von *csgA* anzuhängen. Dieses PCR-Produkt wurde mit dem Restriktionsenzym *Bsal/Eco31I* verdaut und anschließend die 5'-überstehenden, einzelsträngigen DNA-Sequenzen mit dem *Klenow*-Fragment aufgefüllt. Nach der Reinigung des PCR-Produktes wurde es mit *HindIII* geschnitten und in den Zielvektor pMAL-c2x ligiert, der mit den Restriktionsenzymen *XmnI* und *HindIII* geöffnet und zuvor dephosphoryliert wurde. Hierdurch entsteht das Plasmid pMalE-csgA-Strep. Das Plasmid wurde durch Sequenzierung mit den Oligonukleotiden oNH237 bzw. malE und oMA011 auf Richtigkeit des inserierten Gens überprüft.

Dieses Plasmid wurde als Matrize für die Konstruktion von Alaninsubstitutionen im *csgA* Gen (z.B. pMAL-p25<sup>D57A</sup>) mit Hilfe des „QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit“ der Firma Stratagene (Amsterdam) und entsprechender Oligonukleotide verwendet (5.3.10). Zur

Verifikation der Mutation wurde das Plasmid mit dem Oligonukleotid oNH237 bzw. malE und oMA011 sequenziert.

pMA15neu: Zur Herstellung von pMA15neu wurde die Region 1kb *upstream* des Genes *csgA* als Promotorregion an das 5'Ende von *csgA* kloniert. Dazu wurde *csgA* mit der Region 1kb *upstream* von *csgA* per PCR mit den Oligonukleotiden 1000up-csgA-fwd und csgA-HindIII amplifiziert. Das PCR-Produkt und der Zielvektor pSW144 wurden mit den Restriktionsenzymen *SacI* und *HindIII* verdaut, der Vektor wurde zudem dephosphoryliert. Nach der Ligation des Fragmentes in den Vektor entsteht das Plasmid pMA15neu. Das Plasmid wurde durch Sequenzierung unter anderem mit den Oligonukleotiden pSW144-seq-1, pSW144-seq-2, pSW144-seq-3 und csgA-seq2 auf Richtigkeit des inserierten Gens überprüft.

Dieses Plasmid wurde als Matrize für die Konstruktion von Alaninsubstitutionen im *csgA* Gen (z.B. p25<sup>D57A</sup>) mit Hilfe des „QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit“ der Firma Stratagene (Amsterdam) verwendet (5.3.10). Zur Überprüfung der Mutation wurde das Plasmid mit dem Oligonukleotid M13 (-43) sequenziert.

#### 4.2.3 Oligonukleotide

Die Experimente dieser Arbeit wurden mit verschiedenen synthetischen Oligonukleotiden durchgeführt, die in Tabelle 9 aufgeführt sind.

**Tabelle 9: Oligonukleotide**

Die Basen, die Spaltstellen für Restriktionsenzyme darstellen, sind rot unterlegt. Die grün gekennzeichneten Sequenzen führten bei der Mutagenese zu Basenaustauschen. Sequenzierprimer sind in blau gekennzeichnet.

Oligonukleotide	Sequenz 5' zu 3' Richtung
oMA021	ATCGG <b>GGTCTC</b> GATGCGCTACGTCATCACCGGAGC
oMA022	GCC <b>AAGCTT</b> CTACCAGGGCACTTCGGTC
oMA023	ATCGG <b>GGTCTC</b> GAGCGTGCGCGCGTTCGCCACC
oMA024	ATCGG <b>GGTCTC</b> GCGCGCGTTCGCCACCAAC
oMA025	ATCGG <b>GGTCTC</b> GTTCGCCACCAACGTGTGTACC
oMA026	ATCGG <b>GGTCTC</b> GACCAACGTGTGTACCGGTCCC
oMA027	ATCGG <b>GGTCTC</b> GGTGTGTACCGGTCCCGTGGAC

Oligonukleotide	Sequenz 5' zu 3' Richtung
oMA028	ATCGG <b>GGTCTC</b> GACCGGTCCCGTGGACGTGCTC
oMA029	ATCGG <b>GGTCTC</b> GGTGGACGTGCTCATCAACAAC
oMA030	GGCCAGTGCC <b>AAGCTT</b> CTA <b>TTTTTCGAACTGCGGG</b> <b>TGGCTCC</b> AGGCCGACCAGGGCACTTCGGTCCCCT GGTAG ( <i>Strep-tag</i> )
oMA057	GCGCGCGTTTCGCC <b>GCC</b> AACGTGTGTAC
oMA058	GTACACACGTT <b>GGCGG</b> CGAACGCGCGC
oMA059	CAGCGTGCGCGCG <b>GCC</b> GCCACCAACGTG
oMA060	CACGTTGGT <b>GGCGG</b> CCGCGCGCACGCTG
oMA061	CGACGACAGCGTG <b>GCC</b> GCGTTCGCCACC
oMA062	GGTGGCGAACGCG <b>GCC</b> CACGCTGTCGTCG
oMA063	GGGAGACGACGAC <b>GCC</b> GTGCGCGCGTTC
oMA064	GAACGCGCGCAC <b>GGC</b> GTCGTCGTCTCCC
oMA065	ACGTGGGAGAC <b>GCC</b> GACAGCGTGCG
oMA066	CGCACGCTGTC <b>GGC</b> GTCTCCACGT
oMA070	ATCCATGCGCTG <b>GCC</b> GTGGGAGACGAC
oMA071	GTCGTCTCCCA <b>CGG</b> CCAGCGCATGGAT
oMA072	GCGCTGGACGTG <b>GCC</b> GACGACGACAGCG
oMA073	CGCTGTCGTCGTC <b>GCC</b> CACGTCCAGCGC
oMA074	CTGGACGTGGGAG <b>GCC</b> GACGACAGCGTG
oMA075	CACGCTGTCGTC <b>GGC</b> TCCCACGTCCAG
oMA076	GGGAGACGAC <b>GCC</b> AGCGTGCGCG
oMA077	CGCGCACGCT <b>GGC</b> GTCGTCTCCC
oMA098	ATCGG <b>GGTCTC</b> GGTGGGAGACGACGACAGCGTGC
oMA099	ATCGG <b>GGTCTC</b> GCTGGACGTGGGAGACGACGAC
oMA119	CATGCGCTGGAC <b>GCG</b> GGAGACGACGAC
oMA120	GTCGTCGTCTCC <b>GCG</b> GTCCAGCGCATG
oMA123	CGCATCCATGCG <b>GCG</b> GACGTGGGAGAC
oMA124	GTCTCCACGTC <b>GCG</b> CGCATGGATGCG
oMA125	CGCCTGCGCATCGCT <b>GCG</b> CTGGACGTG
oMA126	CACGTCCAG <b>GCG</b> AGCGATGCGCAGGCG
oMA127	CAACCGCCTGC <b>GCG</b> CCCATGCGCTGGAC
oMA128	GTCCAGCGCATGGG <b>GCG</b> CGCAGGCGGTTG
oMA129	GGCAACCGCCTG <b>GCG</b> ATCCATGCGCTG
oMA130	CAGCGCATGGAT <b>GCG</b> CAGGCGGTTGCC

Oligonukleotide	Sequenz 5' zu 3' Richtung
oMA133	GGCGGGCAACGCCCTGCGCATCCATG
oMA134	CATGGATGCGCAGGGCGTTGCCCCGCC
oMA135	CAGAGGGAGCACGGGCGCTGGAGCC
oMA136	GGCTCCAGCGCCCGTGCTCCCTCTG
oMA137	GCGGGCAACCGCGCGCGCATCCATGCG
oMA138	CGCATGGATGCGCGCGCGGTTGCCCGC
attB left	CGGCACACTGAGGCCACATA
attB right	GGAATGATCGGACCAGCTGAA
attP left	GGGAAGCTCTGGGTGACGAA
attP right	GCTTTCGCGACATGGAGGA
1000up-csgA-fwd (Weis, 2007)	AAA <b>GAGCTC</b> ACCACCGCGATGGGCGCATAGGCG
csgA-HindIII (Weis, 2007)	TTT <b>AAGCTT</b> CTACCAGGGCACTTCGGTCCCC
oMA011 = oNH205 (M13-24F)	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC
oNH237 (malE)	GGTCGTCAGACTGTTCGATGAAGCC
pSW144-seq-1 (Weis, 2007)	GAATTCGAGCTCACCACCGCGATGG
pSW144-seq-2 (Weis, 2007)	GAACAGTTCGCCAGCGACGCGC
pSW144-seq-3 (Weis, 2007)	CGCGTGTTTTGCCAGCGGAAGGC
csgA-seq2 (Weis, 2007)	TGGCGCACGTCACCTCGCGG
malE (Eurofins MWG Operon)	GGTCGTCAGACTGTTCGATGAAGCC
M13 uni (-43) (Eurofins MWG Operon)	AGGGTTTTCCCA GTCACGACGTT

#### 4.2.4 Kultivierung der Bakterien

Die verwendeten Medien, Lösungen und Kunststoff-Laborgeräte wurden mittels feuchter Hitze bei 121°C und 1 bar Überdrucks für 20 Min autoklaviert. Die Sterilisation hitzeempfindlicher Lösungen (Spurenelementlösung, Antibiotika) erfolgte mittels Sterilfiltration (0,22 µm Porendurchmesser). Diese sterilen Lösungen wurden anschließend dem abgekühlten Medium hinzugefügt.

Laborgeräte wie Glaskolben, Metall und Keramik wurden im Heizschrank für 3 h bei 180°C trockener Hitze sterilisiert.

Die Kultivierung der *E. coli* Stämme erfolgte aerob bei 37°C in LB-Medium mit entsprechenden Zusätzen (Tabellen 2 und 3). Für Flüssigkulturen wurden die Bakterien in Erlenmeyerkolben (10 x größeres Kolbenvolumen als Kulturvolumen: 50 ml Kolben für 5 ml Ansatz) oder im speziellen Kunststoffröhrchen auf horizontalen Kreisschüttlertischen bei 200-300 rpm inkubiert, um eine ausreichende Sauerstoffversorgung zu gewährleisten. Das Animpfen des Mediums erfolgte bei *E. coli* Flüssigkulturen direkt mit einer Einzelkolonie.

Für *M. xanthus* wurde 1% CTT-Medium mit den entsprechenden Antibiotika für die Anzucht benutzt (Tabelle 3 und 4). Die Kulturen wurden bei 32°C im Dunkeln gezüchtet. Für das Inokulieren der *M. xanthus* Flüssigkultur, die im Erlenmeyerkolben bei 230 rpm schüttelnd kultiviert wurde, erfolgte die Resuspension einer Einzelkolonie zunächst in 1 ml 1% CTT-Medium in einem sterilen 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß. Anschließend wurde diese Zellsuspension in 5 ml 1% CTT-Medium im 50 ml Erlenmeyerkolben überführt.

Die Flüssigkultur wurde jeweils bis zu einer bestimmten optischen Dichte kultiviert, welche photometrisch bestimmt wurde (Tabelle 1). Für *E. coli* erfolgte die Messung bei einer Wellenlänge von 578 nm und für *M. xanthus* bei 550 nm.

Für die Stammhaltung wurden die Bakterien auf Festmedien kultiviert, wobei das Animpfen der Agarplatten nach der 3-Strich-Technik oder durch das Ausplattieren mit Hilfe des Drigalskispatels erfolgte.

Die Lagerung der Bakterienstämme erfolgte maximal vier Wochen bei 4°C (*E. coli*) bzw. 18°C (*M. xanthus*) auf entsprechenden Festmedien. Für längere Lagerzeiten wurden die Bakterien bei -80°C aufbewahrt. Dafür wurde 1 ml einer frischen Bakterienkultur mit einer sterilen 50% Glycerin-Lösung auf eine Endkonzentration von 10% (für *E. coli*) bzw. 5% (für *M. xanthus*) verdünnt.

#### **4.2.5 Untersuchung der Entwicklung von *M. xanthus***

Für die Analyse der Entwicklungsstadien von *M. xanthus* wurden die Bakterien zur morphologischen Untersuchung auf TPM-Agarplatten (Tabelle 5)

und zur Gewinnung von Gesamtprotein aus hungernden Zellen für Immunoblot Analysen in MC7-Puffer (Tabelle 5) als *Shaking submerged* Kultur inkubiert.

Für die morphologische Analyse während der Entwicklung wurden die Bakterien in 1% CTT-Medium bis zu einer OD<sub>550</sub> zwischen 0,5 und 0,9 inkubiert und danach bei 4700 rpm für 10 Min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in MC7-Puffer auf eine berechnete OD<sub>550</sub> von 7,0 resuspendiert. Die verwendeten TPM-Agarplatten wurden 24 h zuvor gegossen und auf 32°C vortemperierte. Anschließend wurden jeweils 3 x 20 µl der resuspendierten Zellen auf die Platten getropft und auf der Laborbank getrocknet, bevor sie bei 32°C inkubiert wurden. Die Aggregation und Fruchtkörperbildung wurde in der Regel alle 24 h (24 – 120 h) im Stereomikroskop (Leica MZ75, Leica, Wetzlar) photographisch dokumentiert.

Für die *Shaking submerged* Kultur wurden die Zellen mit MC7-Puffer auf eine OD<sub>550</sub> von 1,4 konzentriert und in Erlenmeyerkolben schüttelnd bei 32°C inkubiert. Die Probenentnahme erfolgte in der Regel nach 0 h, 6 h, 12 h, 18 h und 24 h. Für jeden Zeitpunkt wurden 1 ml Zellen steril entnommen, die Zellen pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -20°C gelagert. Zur Analyse wurden die Proben in 80 µl SDS-Probenpuffer mit Proteaseinhibitoren (50 mM Tris-HCl, pH 6,8; 4% SDS; 12% Glycerin; 0,005% Bromphenolblau; 2% β-Mercaptoethanol; 5 µg/ml Leupeptin; 0,7 µg/ml Pepstatin; 0,6 mM PMSF) aufgenommen, 5 Min bei 95°C erhitzt und über ein SDS-Polyacrylamidgel (5.4.7) aufgetrennt.

#### 4.2.6 Bestimmung der Sporulation von *M. xanthus*

Um die Gesamtsporenzahl von *M. xanthus* zu bestimmen, wurden die Zellen vegetativ kultiviert und anschließend, wie in 5.2.5 beschrieben, auf TPM-Agar 120 h entwickelt. Die Fruchtkörper aus 5 Tropfen zu jeweils 20 µl wurden vollständig von den Agarplatten geerntet und in 800 µl TPM-Puffer aufgenommen. Die Ansätze wurden bei 50°C für 2 h inkubiert, um vegetative Zellen abzutöten. Anschließend erfolgte ein Zellaufschluss per Ultraschall für 2x 15 s. Die Zellen wurden dabei auf Eis gekühlt. Die Anzahl der Gesamtsporen wurde in entsprechenden Verdünnungen mit der Thomazählkammer ermittelt. Dabei wurden in zwei Wiederholungen 4 der 16 Kleinquadrate eines

Großquadrates gezählt und die Sporenzahl auf die Gesamtsporenzahl pro definiertes Volumen umgerechnet.

### 4.3 Molekularbiologische Methoden

#### 4.3.1 Präparation, Extraktion und Konzentrationsbestimmung von DNA aus *E. coli* und *M. xanthus*

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde das „Zyppy™ Plasmid-Miniprep Kit“ von Zymo Research (HiSS-Diagnostics, Freiburg) verwendet.

Die DNA-Präparation aus Zellen von *M. xanthus* erfolgte nach dem Protokoll von Avery und Kaiser (Avery & Kaiser, 1983). Zur DNA-Gewinnung wurde eine *M. xanthus* Kolonie in 8 ml 1% CTT-Medium (Tabelle 4) bei 32°C und 230 rpm bis zu einer OD<sub>550</sub> > 1 kultiviert und anschließend bei 8000 x g für 10 Min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 400 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 8) resuspendiert. Nun folgte die Zugabe von 80 µl einer 2,5 mg/ml Proteinase K (PK)-Stammlösung (PK in 10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 10 mM NaCl) und 80 µl eines Rapid-Lysis-Mix (5% SDS; 0,125 M EDTA; 0,5 M Tris-HCl, pH 9,4; sterilfiltriert). Der Reaktionsansatz wurde 1 h bei 37°C inkubiert. Mit einer Kanüle (Größe 22) und einer Spritze (1 ml) erfolgte durch Auf- und Abziehen des Kolbens das Scheren der DNA. Nach der Zugabe von 1 Volumen Phenol erfolgten mehrere Phenol- und Chloroform-Extraktionsschritte (Sambrook *et al.*, 1989). Die Fällung der DNA erfolgte mit 2 Volumen 96% Ethanol bei 8000 x g für 10 Min. Daraufhin wurde die DNA mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen, in 200 µl TE-Puffer aufgenommen und über Nacht bei 4°C leicht geschüttelt. Die Konzentration der DNA wurde mit dem Nanodrop ND-1000 (Tabelle 1) bestimmt.

Zur Überprüfung der Integration von Genen in *M. xanthus* Mutanten wurde die genomische DNA unter Zugabe der „Lyse-N-Go™ PCR Reagenz“ von Pierce (Rockford, USA) nach Herstellerangaben präpariert, bevor diese mittels PCR analysiert wurde (5.3.8).



### 4.3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion erfolgte mit der *PfuUltra™II* Polymerase der Firma Stratagene (Amsterdam) und dem 5 PRIME MasterMix der Firma 5 PRIME GmbH (Hamburg). Die notwendigen Komponenten für die PCR mit der *PfuUltra™II* Polymerase wurden nach Herstellerangaben zugegeben (Tabelle 10).

**Tabelle 10: PCR-Protokoll *PfuUltra™II* DNA Polymerase (50 µl Ansatz)**

Komponente	Volumen
10x <i>PfuUltra™II</i> Buffer	5 µl
dNTP Mix (10 mM je dNTP)	2,5 µl
2 Primer (je 10 µM)	je 2,5 µl
5% DMSO	2,5 µl
genomische DNA bzw. Plasmid-DNA (100 ng)	1 µl
<i>PfuUltra™II</i> DNA Polymerase	0,5 µl

Zur Überprüfung der Integrationen von Plasmid-DNA wurde der 5 PRIME MasterMix der Firma 5 PRIME GmbH (Hamburg) als PCR-Fertigmix verwendet, dem Wasser, DMSO und die Primer zugefügt werden mussten (Tabelle 11).

**Tabelle 11: PCR-Protokoll 5 PRIME MasterMix (20 µl Ansatz)**

Komponente	Volumen
2,5 x 5 PRIME MasterMix Solution	10 µl
2 Primer (je 10 µM)	je 1 µl
DMSO	2 µl
genomische bzw. Plasmid-DNA (10 - 200 ng genomische DNA/ 0,1 - 20 ng Plasmid-DNA)	x µl

Die PCR-Programme wurden je nach erwarteter Fragmentgröße in der Anlagerungstemperatur, der Polymerisationsdauer und der Zyklenanzahl variiert, wobei der PCR das in Tabelle 12 aufgelistete Prinzip zugrunde lag. Die Optimierung der PCR-Programme resultierte aus der Nutzung des Mastercycler eppgradient der Firma Eppendorf (Hamburg), wobei die optimierten PCR-

Reaktionen anschließend im Mastercycler personal (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt wurden.

**Tabelle 12: Standard PCR-Programm** (\* = 28x wiederholt)

Schritt	Temperatur	Zeitdauer
Initiale Denaturierung	95°C	3 Min
Denaturierung *	95°C	30 s
Primeranlagerung *	50-61°C (5-10°C unterhalb der Schmelztemperatur der verwendeten Primer)	30 s
Polymerisation *	72°C	~ 1 Min pro kb
Finale Polymerisation	72°C	4 Min
Aufbewahrung	4°C	∞

**Tabelle 13: PCR-Programm (5 PRIME MasterMix)** (\* = 35x wiederholt)

Schritt	Temperatur	Zeitdauer
Initiale Denaturierung	94°C	3 Min
Denaturierung *	94°C	30 s
Primeranlagerung *	50 - 60°C	30 s
Polymerisation *	72°C	~ 1 Min pro kb
Finale Polymerisation	72°C	6 Min
Aufbewahrung	4°C	∞

#### 4.3.3 Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden Gelkammern mit einem Elektrodenabstand von 12 cm verwendet, die vom MPI Marburg hergestellt wurden. Die Proben wurden dazu in Taschen von 1% Agarosegelen in 1x TBE-Puffer (Invitrogen, Karlsruhe) pipettiert und bei einer Spannung von 120 V ihrer Größe nach aufgetrennt. Ethidiumbromid wurde als interkalierender Farbstoff verwendet, um die DNA anzufärben. Dieser lag als 10 mg/ml Stammlösung vor und wurde dem Agarosegel in einer 1:10000 Verdünnung zugefügt. Als Größen- und Mengenstandard dienten die DNA-Marker „Hyperladder I-V“ von Bioline (Luckenwalde). Die DNA-Proben wurden zum Beladen der Geltaschen mit „6x Loading Dye Solution“ von Fermentas (St. Leon-Rot) versetzt. Nach der Gelelektrophorese wurde die DNA

durch das Ethidiumbromid mit einem 2UV-Transilluminator (Tabelle 1) bei einer Wellenlänge von 365 nm sichtbar gemacht und mit einem Videoprintgerät Mitsubishi Electronic P93E dokumentiert.

Die Isolierung von DNA aus dem Agarosegel und die Reinigung von PCR-Produkten erfolgte unter Verwendung des „Zymoclean™ Gel DNA Recovery-Kits“ bzw. des „DNA Clean & Concentrator™-5-Kits“ der Firma Zymo Research (HiSS-Diagnostics, Freiburg).

#### **4.3.4 Restriktion und Ligation von DNA-Fragmenten**

Der Restriktionsverdau von Plasmid- oder linearer DNA erfolgte mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen nach den Herstellerangaben. Dabei wurden die Ansätze für mindestens 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend zur Kontrolle mittels Elektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt (5.3.3).

Zur Ligation wurde das zu inserierende Fragment im 5-fachen Überschuss mit dem Vektor und der T4-DNA-Ligase des „Rapid DNA Ligation Kit“ von Fermentas (St. Leon-Rot) nach Herstellerangaben inkubiert. Um eine Selbstligation des Vektors zu verhindern, wurde dieser mit Antarctic Phosphatase® von New England Biolabs (Frankfurt a.M.) gleichzeitig mit dem Verdau des Vektors oder spätestens vor der Ligation dephosphoryliert.

#### **4.3.5 Herstellung elektrokompenter *E. coli* Zellen**

Für die Herstellung elektrokompenter Zellen wurden 500 ml LB-Medium (Tabelle 2) mit den entsprechenden *E. coli* Zellen angeimpft und bis zu einer OD<sub>578</sub> von 0,5-0,6 bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurde die Kultur 15 Min auf Eis abgekühlt und hinterher für 20 Min bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde 3 x mit jeweils 500 ml eiskaltem, sterilem Wasser gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 50 ml eiskaltem Wasser aufgenommen, in ein 50 ml-Reaktionsgefäß überführt und ein letztes Mal zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde nun in 2 ml sterilem 10% Glycerin resuspendiert, zu jeweils 60 µl aliquotiert und bei -80°C bis zur Verwendung aufbewahrt.

#### 4.3.6 Herstellung chemischkompetenter *E. coli* Zellen

Für die Herstellung chemischkompetenter Zellen wurde die Rubidium-Chlorid-Methode verwendet. Dazu wurden 250 ml LB-Medium (Tabelle 2), das 20 mM  $\text{MgSO}_4$  enthielt, mit den entsprechenden *E. coli* Zellen angeimpft und bis zu einer  $\text{OD}_{578}$  von 0,4-0,7 bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurde die Kultur 5 Min bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 100 ml eiskaltem TFM1-Puffer (30 mM KAc; 10 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 50 mM  $\text{MnCl}_2$ ; 100 mM RbCl; 15% Glycerin; pH 5,6) resuspendiert und die Zellsuspension für 5-10 Min bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet vorsichtig in 10 ml eiskaltem TFB2-Puffer (10 mM MOPS; 75 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 10 mM RbCl; 15% Glycerin; pH 6,5) aufgenommen und auf Eis für 15-60 Min inkubiert. Schließlich wurden die Zellen in 100-200  $\mu\text{l}$  Aliquots abgefüllt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C bis zur Verwendung gelagert.

#### 4.3.7 Transformation von *E. coli*

Für die Transformation elektrokompenter *E. coli* Zellen sollte der Salzgehalt des Ligationsansatzes mittels Dialyse vermindert werden. Dazu wurden 10  $\mu\text{l}$  des Ansatzes für 20 min auf einer VSPW-Membran von Millipore (Schwalbach) gegen Wasser dialysiert. 50  $\mu\text{l}$  elektrokompenter Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit dem dialysierten Ansatz vermischt und in einer gekühlten Elektroporationsküvette mit 1 mm Spaltbreite (Gene Pulser® Cuvette; BioRad, München) überführt. Danach erfolgte umgehend die Elektroporation am Gene Pulser Xcell (Tabelle 1) mit einem Puls von 1,8 kV, 200  $\Omega$  und 25  $\mu\text{F}$ . Der Ansatz wurde sofort mit 1 ml vorgewärmtem SOC-Medium (Tabelle 2) vermischt, für mindestens 1 h bei 37°C schüttelnd inkubiert, hinterher auf Selektivagarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Für die Transformation chemischkompetenter *E. coli* Zellen wurden diese auf Eis aufgetaut und mit 100  $\mu\text{l}$  Ligationsansatz gemischt. Danach wurde der Ansatz für 20 Min auf Eis inkubiert. Die Transformation per Hitzeschock erfolgte für 1 Min bei 42°C im Wasserbad. Der Ansatz wurde für 5 Min auf Eis abgekühlt, danach mit 500  $\mu\text{l}$  vorgewärmtem SOC-Medium (Tabelle 2) für mindestens 1 h bei 37°C schüttelnd inkubiert, hinterher auf Selektivagarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Kontrolle der erhaltenen

Transformanden wurde die Plasmid-DNA isoliert und per Restriktionsanalyse (5.3.4), PCR (5.3.2) und/oder Sequenzierung (5.3.9) überprüft.

#### 4.3.8 Transformation von *M. xanthus*

Für die Transformation von *M. xanthus* wurden 5 ml antibiotikafreies CTT-Medium (Tabelle 4) mit einer Kolonie angeimpft und bei 32°C bis zu einer OD<sub>550</sub> von 0,5-0,9 inkubiert. 1,5 ml dieser *M. xanthus* Kultur wurden für 1 Min bei 13000 rpm und RT zentrifugiert, das Zellpellet daraufhin 2 x mit je 1 ml sterilem Wasser gewaschen und in 40 µl sterilem Wasser aufgenommen. Dann wurden die Zellen mit der entsprechenden Plasmid-DNA vermischt, dieser Ansatz in eine gekühlten BioRad Küvette mit 1 mm Spaltenbreite (Gene Pulser® Cuvette; Bio-Rad, München) überführt und mit einem Puls von 0,65 V, 400 Ω und 25 F im Gene Pulser Xcell (Tabelle 1) elektroporiert. Sofort nach der Pulsgabe wurde 1 ml CTTYE-Medium (Tabelle 4) in die Küvette gegeben und der Reaktionsansatz unverzüglich in einen 50 ml Erlenmeyerkolben mit 3 ml CTTYE-Medium (Tabelle 4) überführt. Dieser Ansatz wurde für mindestens fünf Stunden (1 Verdopplungszeit von *M. xanthus*) bis maximal über Nacht bei 32°C inkubiert. Danach wurde der Ansatz in verschiedenen Verdünnungen mit 4 ml 55°C warmen CTT-Soft-Agar (Tabelle 4) vermischt und auf 1% CTT-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum gegossen. Die Ansätze wurden bei 32°C für 4-5 Tage inkubiert und eine Einzelkolonie auf 1% CTT-Platten mit dem entsprechenden Selektionsmarker ausgestrichen bis eine Reinkultur vorlag.

Die Verifikation der Integration von Plasmid-DNA durch Sequenz-spezifische Rekombination in die *phage Mx8-attB site* auf dem *M. xanthus* Chromosomen erfolgte mittels PCR. Für die Gewinnung von genomischer DNA als Matrize für die PCR wurde eine Einzelkolonie des transformierten *M. xanthus* Stammes in 10 µl EB-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) plus 10 µl Lyse-N-Go™ PCR Reagent der Firma Pierce (Rockford, USA) resuspendiert, 10 Min bei 95°C und 1000 rpm schütteln erhitzt, 5 Min auf Eis gekühlt und anschließend 5 Min bei 13000 rpm zentrifugiert. 1 µl des Überstands wurde in die PCR-Reaktion unter Verwendung des 5 PRIME MasterMix (5.3.2) eingesetzt. Zur Überprüfung eines Stammes wurden drei Reaktionsansätze mit verschiedenen *attB*- und *attP*-Oligonukleotidpaarungen (Tabelle 9) angesetzt

(Magrini *et al.*, 1999). Nach der PCR wurden die amplifizierten DNA-Fragmente mittels Gelelektrophorese auf ihre Richtigkeit überprüft (5.3.3).

#### **4.3.9 Sequenzierung von DNA**

Sequenzierungen wurden zunächst nach dem Kettenabbruchverfahren nach Sanger in der Abteilung Ökophysiologie im MPI Marburg durchgeführt. Dazu wurde das „Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit“ von Applied Biosystems (Darmstadt) nach Angaben des Herstellers verwendet und die Proben mit dem „3130 Genetic Analyser“ von Applied Biosystem (Darmstadt) analysiert. Das Beladen und Starten des Sequenziergerätes erfolgte durch technisches Personal. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem „Vector NTI Advance™ 11-Software“ Paket von Invitrogen (Karlsruhe) bearbeitet.

Aktuell wird die Sequenzierung bei der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) durchgeführt.

#### **4.3.10 Gerichtete Mutagenese**

Die Alaninsubstitutionen wurden mit Hilfe des „QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit“ der Firma Stratagene (Amsterdam) und entsprechenden Oligonukleotiden (Tabelle 9) in das Plasmid pMalE-csgA-strep bzw. pMA15neu eingebracht. Dafür wurde durch eine abgewandelte PCR eine Amplifikation des gesamten Plasmids mit dem entsprechenden inserierten Gen durchgeführt. Dabei wurden modifizierte Oligonukleotide verwendet, die die mutierte DNA-Sequenz trugen und somit während der PCR zu einer Punktmutation an der gewünschten Stelle führten. Der PCR-Ansatz ist, den Herstellerangaben des verwendeten Kits entsprechend, in Tabelle 14 aufgeführt. Das PCR-Programm wurde so verändert (Tabelle 15), dass es zu einer Amplifikation des gesamten Vektors kommt.

Nach der PCR wurde 1 µl *DpnI* (10 U/µl) zu dem Ansatz gegeben und für 1 h bei 37°C verdaut, um die methylierte Matrizen-DNA zu entfernen. Dann wurde 1 µl des verdauten Ansatzes mit der verbliebenen mutierten DNA in *E. coli* XL1-Gold *ultracompetent* Zellen (Tabelle 7) transformiert und auf Selektivmedium inkubiert. Die Vektor-DNA der Transformanden wurde mit dem

„Zyppy™ Plasmid-Miniprep Kit“ von Zymo Research (HiSS-Diagnostics, Freiburg) isoliert und schließlich sequenziert.

**Tabelle 14: PCR-Ansatz Mutagenese *PfuTurbo* DNA Polymerase (50 µl Ansatz)**

Komponente	Volumen
10x Reaction Buffer	5 µl
Plasmid-DNA (50 ng)	x µl
2 Primer (je 125 ng)	x µl
dNTP Mix	1 µl
QuickSolution	3 µl
<i>PfuTurbo</i> DNA Polymerase (2,5 U/µl)	1 µl

**Tabelle 15: PCR-Programm zur gerichteten Mutagenese**

Schritt	Zyklen-anzahl	Temperatur	Zeitdauer
Initiale Denaturierung	1	95°C	1 Min
Denaturierung	18	95°C	50 s
Primeranlagerung		60°C	50 s
Polymerisation		68°C	1 Min pro kb Plasmidgröße
Finale Polymerisation	1	68°C	7 Min

## 4.4 Biochemische Methoden

### 4.4.1 Heterologe Produktion von Proteinen in *E. coli*

Um Proteine heterolog in *E. coli* zu produzieren, wurde der Stamm Rosetta™ 2(DE3) verwendet. Es handelt sich dabei um ein T7-Polymerase-abhängiges System, welches mit IPTG induziert wird und das Plasmid pRARE2 trägt. Dieses Plasmid codiert für sieben seltene tRNAs und gewährleistet so die optimierte Translation unabhängig von der *codon usage* von *E. coli*.

Das Plasmid mit dem Zielgen wurde in den Expressionsstamm transformiert und in LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika kultiviert (5.2.4). Zum generellen Nachweis der Produktion eines Proteins wurde ein Kulturvolumen von 10-250 ml eingesetzt, wobei für die spätere Proteinreinigung Volumen von bis zu 1000 ml genutzt wurden. Als Vorkultur wurden 5-10 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika mit dem Glycerin-Stock des transformierten Rosetta™ 2(DE3) Stammes angeimpft und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Aus der Vorkultur wurde die Hauptkultur beimpft und nach dem Erreichen einer OD<sub>578</sub> von 0,4-0,6 wurde diese mit 0,1-1 mM IPTG versetzt. Die Kultur wurde für eine bestimmte Dauer (2-24 h) bei einer bestimmten Temperatur (18-22°C) bis zur Zellernte schüttelnd inkubiert. Als Kontrolle der Proteinproduktion erfolgte eine Probenentnahme vor Zugabe von IPTG und weitere zu verschiedenen Zeitpunkten während, sowie nach Abschluss der Produktion. Im Laufe der Versuchsreihe können verschiedene Parameter wie Induktionsdauer, -temperatur und IPTG-Endkonzentration variiert werden, um eine maximale Proteinausbeute zu erzielen. Die Produktionskontrollen wurden zentrifugiert und das Pellet mit einer Protein-Endkonzentration von 1 g/l in 1x SDS-Puffer aufgenommen. Die Analyse erfolgte nach einer SDS-PAGE durch Coomassie-Färbung (5.4.7) oder Immunoblot Analyse(5.4.8).

### 4.4.2 Zellaufschluss unter nativen Bedingungen

Nach der Produktion eines Proteins wurde die Bakterienkultur durch Zentrifugation bei 4700 rpm für 15 Min bei 4°C pelletiert und das Zellpellet in



entsprechendem Puffer resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall (Tabelle 1). Hierzu wurde die Zellsuspension in ein Rosettengefäß entsprechender Größe gegeben und in einem Eisbad gekühlt. Die Zellen wurden z.B. mit der Mikrospritze des Gerätes mehrere Minuten in Intervallen beschallt bis die trübe Zellsuspension klar war. Der vollständige Aufschluss der Zellen wurde am Mikroskop kontrolliert. Um Einschlusskörper, Zelltrümmer und nicht aufgeschlossene Zellen zu entfernen, wurde bei 4700 rpm und 4°C für 15 Min zentrifugiert. Anschließend wurden die Fraktionen auf Eis bei 4°C im Kühlraum aufbewahrt. Von dem so gewonnenen Überstand und dem Pellet wurden Proben entnommen, um durch SDS-PAGE zu ermitteln (5.4.7), ob das Zielprotein löslich war oder in Einschlusskörpern vorlag.

#### **4.4.3      Produktion und Reinigung von MalE-tag Fusionsproteinen in *E. coli***

Der für die Herstellung von MalE-tag Fusionsproteinen verwendete pMAL-c2x-Vektor enthielt die Sequenz für einen MalE-tag, welcher am 5'-Ende eines inserierten Gens kodiert wurde und bei der Proteinreinigung mittels Affinitätschromatographie benötigt wurde. Mit Hilfe spezifischer Primer wurde das Zielgen amplifiziert und das PCR-Produkt in den Vektor ligiert. Das Zielprotein wurde somit als Fusionsprotein mit N-terminalem MalE-tag produziert.

Zur Produktion des Zielprotein wurde LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 0,2% Glukose mit einer Übernachtskultur angeimpft und bei einer OD<sub>578</sub> von 0,5 mit IPTG (Endkonzentration: 0,3 mM) versetzt. Es folgte eine Inkubation von 2 h bei ~22°C auf dem Schüttler. Zu beachten war die Entnahme von Zellen zur Kontrolle der Proteinproduktion. Die Zellen wurden per Zentrifugation für 10 Min bei 4700 rpm geerntet, in 5 ml Säulenpuffer (20 mM Tris-HCl, pH 7,4; 0,2 M NaCl; 1 mM DTT; 1 mM EDTA) resuspendiert und bei -20°C gelagert.

Die Reinigung des Proteins fand bei 4°C im Kühlraum statt. Für die Affinitätschromatographie wurden 3 ml Amylosematerial in eine Plastiksäule gegeben und mit 8 Säulenvolumen Säulenpuffer gewaschen. Parallel wurden die Zellen per Ultraschall aufgeschlossen (5.4.2) und die Zellsuspension in

insgesamt 40 ml Säulenpuffer aufgenommen. Um Zelltrümmer und unlösliche Proteine zu entfernen, wurde die Zellsuspension bei 4700 rpm bei 4°C zentrifugiert und der Überstand über die Amylosesäule gegeben. Danach folgte ein Waschschrift mit 12 Säulenvolumen Säulenpuffer, um ungebundene Proteine zu entfernen. Für die Elution des MalE-Fusionsproteins wurden 5 Fraktionen a 500 µl Elutionspuffer (Säulenpuffer + 10 mM Maltose) gesammelt und die Proteinkonzentration pro Elutionsschnitt bestimmt. Abschließend wurden die Elutionsfraktionen mit den höchsten Proteinkonzentrationen vereinigt und gegen A50-Puffer (10 mM MOPS; 1 mM CaCl<sub>2</sub>; 1 mM MgCl<sub>2</sub>; 50 mM NaCl; pH 7,2) über Nacht bei 4°C dialysiert. Die Analyse der Reinigung erfolgte über SDS-PAGE (5.4.7).

#### **4.4.4 Reinigung von Einschlusskörpern und Rückfaltung von Proteinen**

*E. coli* Zellen wurden kultiviert und durch Zentrifugation geerntet. 5 g Zellen (Feuchtgewicht) wurden in 25 ml Puffer A (0,1 M Tris-HCl, pH 7; 1 mM EDTA) bei 4°C mit einem Ultraturrax (10000 rpm) homogenisiert. Danach wurde 1,5 mg Lysozym pro g Zellen zugegeben, mit dem Ultraturrax vermischt und für 30 Min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen per Ultraschall aufgeschlossen (5.4.2). Um die DNA zu verdauen, wurde den aufgeschlossenen Zellen MgCl<sub>2</sub> (3 mM Endkonzentration) und DNase (10 µg/ml Endkonzentration) zugefügt und die Zellsuspension für 30 Min bei RT inkubiert. Danach wurde der Suspension das 0,5-fache Volumen an Puffer B (60 mM EDTA; 6% Triton X-100; 1,5 M NaCl; pH 7,0) hinzugegeben und für 30 Min bei 4°C inkubiert. Die Einschlusskörper wurden durch eine Zentrifugation bei 20000 rpm für 10 Min bei 4°C pelletiert. Dieses Pellet wurde in Puffer C (0,1 M Tris-HCl, pH 7; 20 mM EDTA) mit einem Ultraturrax resuspendiert und die Zentrifugation wiederholt. Das Pellet aus Einschlusskörper konnte dann bis zu zwei Wochen bei -20°C gelagert werden.

50 mg des Einschlusskörper-Pellets wurden in 5 ml Puffer D (6 M GdmCl; 0,1 M Tris-HCl, pH 8; 100 mM DTT; 1 mM EDTA) resuspendiert und für 2 h bei RT inkubiert. Der pH wurde danach durch tropfenweise Zugabe von 1 M HCl auf pH 3-4 gesenkt und durch Zentrifugation bei 10000 rpm wurden die

unlöslichen Zelltrümmer entfernt. Um das DTT komplett zu entfernen, wurde zunächst 2 x für 2 h gegen 500 ml Puffer E (4 M GdmCl; 10 mM HCl) bei RT dialysiert, danach erneut gegen 1 Liter 4 M GdmCl bei 4°C über Nacht. Am nächsten Tag wurde die Proteinkonzentration bestimmt und das Protein in 4 mg Aliquots bei -80°C gelagert.

Um das Protein zurück zu falten, wurden 4 mg Proteinlösung tropfenweise in 80 ml Rückfaltungspuffer (0,1 M Tris-HCl, pH 8,5; 1 mM DTT; 0,5 M L-Arginin HCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 5 mM CaCl<sub>2</sub> – hier speziell für PopC-Rückfaltung) pipettiert. Dann wurde die Lösung bei 4°C über Nacht auf einem Magnetrührer gerührt. Am nächsten Tag wurden die 80 ml Proteinlösung mittels Ultrafiltration mit Amicon® Ultracel-10k Filtern bzw. Microcon® Ultracel YM-10 Filtern der Firma Millipore GmbH (Schwalbach/Ts) auf 500 µl konzentriert. Danach wurde das Protein in A50MC Puffer (10 mM MOPS; 5 mM CaCl<sub>2</sub>; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 50 mM NaCl; pH 7,2) umgepuffert und direkt in den *in vitro*-Proteasetest (5.4.10) eingesetzt.

#### 4.4.5 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmungen von Proteinen wurde mit dem „BioRad Protein Assay“ (Bio-Rad, München) nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976) oder dem Nanodrop N-1000 (Tabelle 1) durchgeführt.

Für die Bradford-Bestimmung wurde 0,1 g/l BSA als Proteinstandard verwendet. Die Proben wurden gemäß des unten aufgeführten Pipettierschemas mit dem Reagenz versetzt und im Dunkeln für 15 Min bei RT inkubiert. Bei einer Wellenlänge von 595 nm wurde die Absorption der Proben am Photometer (Tabelle 1) gemessen, mit der Standardkurve verglichen und so die Proteinkonzentration bestimmt.

Konzentration	0 g/l	2 g/l	4 g/l	6 g/l	8 g/l
BSA (0,1 g/l)	0 µl	20 µl	40 µl	60 µl	80 µl
Wasser	800 µl	780 µl	760 µl	740 µl	720 µl
BioRad Protein Assay-Reagenz	je 200 µl pro Ansatz				
Protein-Probe	1 µl (1:10 Verdünnung) + 799 µl H <sub>2</sub> O + 200 µl Reagenz				

#### 4.4.6 Ultrafiltration von Proteinen

Die Ultrafiltration mit Microcon<sup>®</sup>- und Amicon<sup>®</sup>-Ultra Filter von Millipore (Schwalbach) wurde für das Konzentrieren von Proteinlösungen, aber auch für den Austausch von Pufferlösungen verwendet. Die Auswahl der Filter war abhängig von der Proteingröße und dem Zielvolumens nach der Ultrafiltration. Die Benutzung erfolgte nach Herstellerangaben.

#### 4.4.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteingemischen und zur Größenbestimmung von Proteinen wurde die Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen nach Laemmli durchgeführt (Laemmli, 1970). Dazu wurden 8-16% SDS-Polyacrylamidgele verwendet. In Tabelle 16 ist die Zusammensetzung der Gele aufgeführt, die in Mini-Protean 3 Cell Elektrophorese-Apparaturen (Tabelle 1) hergestellt wurden. Die Proben wurden in 1x SDS-Probenpuffer aufgenommen und bei 95°C für 5 Min erhitzt, um die Proteine zu denaturieren und Disulfidbrücken durch das im Puffer enthaltene DTT zu reduzieren. Als Größenmarker wurde unter anderem der „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ von Fermentas (St. Leon-Rot) verwendet.

**Tabelle 16: SDS-PAGE nach Laemmli**

Komponenten	8%-Gel	14%-Gel	16%-Gel
<b>Trenngel (2 Mini-Gele)</b>			
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
40% Acrylamid/Bisacrylamid (37:1)	2,0 ml	3,5 ml	4,0 ml
H <sub>2</sub> O	5,5 ml	4,0 ml	3,5 ml
TEMED	7,0 µl	7,0 µl	7,0 µl
10% APS	60 µl	60 µl	60 µl
<b>Sammelgel (1 Gel)</b>			
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8		250 µl	
40% Acrylamid/Bisacrylamid (37:1)		100 µl	
H <sub>2</sub> O		650 µl	
TEMED		3 µl	
10% APS		6 µl	

Proteinproben wurden per SDS-PAGE in Mini-Protean 3 Cell Elektrophorese-Apparaturen (Tabelle 1) zunächst mit einer Spannung von 100 V aufgetrennt bis die Bande des im Probenpuffer enthaltenen Farbstoffs Bromphenolblau das Trenngel erreicht hatte. Dann wurde die Spannung auf bis zu 180 V erhöht und nachdem die Lauffront den unteren Rand des Trenngels erreicht hat, wurde die Elektrophorese gestoppt. Um die Proteinbanden sichtbar zu machen, wurde das Gel unter Schütteln in eine Coomassie Brilliant Blau R 250-Färbelösung gelegt und anschließend mit Wasser entfärbt, um überschüssigen und ungebundenen Farbstoff zu entfernen. Sollte das Gel mit Silber gefärbt werden, wurde das Kitsystem „PlusOne™ Silver Staining Kit Protein“ von GE Healthcare (Freiburg) nach Herstellerangaben benutzt. Sollten Proteine mit Antikörpern spezifisch detektiert wurden, wurde das Gel, ohne vorige Färbung, für die Immunoblot Analyse weiterverwendet (5.4.8).

#### **4.4.8 Nachweis von Proteinen durch Immunoblot Analyse (Western Blot)**

Die durch Immunoblot Analyse zu untersuchenden Proteine wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen und auf einem entsprechenden SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Als Größenstandard dient hauptsächlich der „Page-Ruler Prestained Protein Ladder“ von Fermentas (St. Leon-Rot). Die Elektrophorese wurde wie in 5.4.7 beschrieben durchgeführt und die Proteine wurden vom ungefärbten Gel durch Elektroblothing in einer „Hoefer TE 77 semi-dry tranfer unit“ der Firma Amersham Bioscience (München) auf eine Nitrozellulosemembran (0,2 µm Porengröße) übertragen. Als Transferpuffer wurde ein diskontinuierliches Tris/Glycin-Puffersystem verwendet (Tabelle 17). Der Transfer der Proteine erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 0,8 mA pro cm<sup>2</sup> Membran für 1,5 bis 2 h. Im Anschluss wurde die Membran zum Absättigen unspezifischer Bindestellen in 5% Milch (Milchpulver in TBS-T: 20 mM Tris-HCl; 137 mM NaCl; 0,05% TWEEN 20; pH 7,6) bei RT für mindestens 30 Min oder bei 4°C über Nacht schütteln inkubiert. Die Bindung des spezifischen Primärantikörpers, der aus Kaninchen-Serum gewonnen wurde, erfolgte im Verhältnis 1:100 bis 1:10000, abhängig vom Antikörper (Tabelle 18), verdünnt in 2% Milch bei RT für 2 h auf dem Schüttler. Nach mehreren Waschschritten in TBS-T (2 x 5 Min und 1 x 15 Min) erfolgte die

Bindung des Sekundärantikörpers anti-Kaninchen-IgG aus der Ziege als Konjugat mit Peroxidase aus Meerrettich von der Firma Pierce (Bonn). (Verdünnung 1:15000 in 2% Milch). Nach einer 1-stündigen Inkubation wurde die Membran erneut mit TBS-T gewaschen (1 x 15 Min und 4 x 5 Min). Die Detektion der Proteine erfolgte über Chemilumineszenz.

**Tabelle 17: Transferpuffer für Western-Blots.**

Membranseite (Anode)		Gelseite (Kathode)	
Chemikalien (pro Liter)	End- konzentration	Chemikalien (pro Liter)	End- konzentration
3,03 g Tris	25 mM	6,06 g Tris	50 mM
14,4 g Glycin	192 mM	28,8 g Glycin	384 mM
0,1 g SDS	0,01%	2,0 g SDS	0,2%
250 ml Methanol	25%	100 ml Methanol	10%

Eine weitere Methode zur Bindung von Antikörpern war die Verwendung des „SNAP i.d. Protein detection systems“ (Tabelle 1). Hierbei wurde die geblottete Membran in eine spezielle Halterung eingespannt, an die ein Vakuum angelegt wurde. Durch das Vakuum wurden die einzelnen Antikörperlösungen durch die Schichten der Nitrozellulosemembran gesaugt. Diese Methode war im Gegensatz zur herkömmlichen Methode mit ~40 Min viel schneller in ihrer Durchführung. Im Unterschied wurde statt einer 5% Milchlösung nur eine 0,01% Milchlösung (in TBS-T) zum Blocken unspezifischer Bindestellen verwendet. Dann folgte die Inkubation des ersten Antikörpers für 10 Min in 0,01% Milch. Im Anschluss an die Inkubationszeit wurde die Antikörperlösung durch die Membran gesaugt und die Membran 3x mit TBS-T gewaschen. Der zweite Antikörper wurde für 15 Min inkubiert und anschließend wurde die Membran wiederum 3x mit TBS-T gewaschen. Nach Abschluss der Waschschrte wurde die Membran aus der Halterung genommen und die Proteine per Chemilumineszenz detektiert.

Die Detektion der Proteinbanden erfolgte mit „SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate“ der Firma Pierce (Bonn). Die Membran wurde mit dem Chemilumineszenz Reagenz, das nach Herstellerangaben angesetzt wurde, benetzt und etwa 1 Min inkubiert. Bei der ECL-Reaktion kam es unter alkalischen Bedingungen zur Peroxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-katalysierten Oxidation von

Luminol, welches kurzzeitig in einen angeregten Zustand versetzt wurde. Beim Zerfall dieses Intermediat wurde Licht emittiert, welches die Proteine durch Schwärzungen eines Röntgen-Film (CL-Xposure Film von Pierce (Bonn)) sichtbar machte. Die Entwicklung des Röntgenfilms erfolgte in der „FPM-100A Entwicklungsmaschine“ von Fujifilm Europe (Düsseldorf). Eine alternative Möglichkeit der Detektion der Chemilumineszenz erfolgte digital durch den „Luminescent Image Analyser LAS~4000“ (Tabelle 1).

**Tabelle 18: Verwendete Antikörper**

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
$\alpha$ -p25	Antikörper gegen das gesamte Protein p25	(Kruse <i>et al.</i> , 2001)
$\alpha$ -PepC	Peptidantikörper gegen den C-Terminus von p25	(Lobedanz & Sogaard-Andersen, 2003)
$\alpha$ -PilC	Antikörper gegen das gesamte Protein PilC	(Rolbetzki <i>et al.</i> , 2008)
$\alpha$ -PilQ	Antikörper gegen das gesamte Protein PilQ	(Bulyha <i>et al.</i> , 2009)
$\alpha$ -Tgl	Antikörper gegen das gesamte Protein Tgl	I. Bulyha, MPI Marburg

#### 4.4.9 Quantifizierung von Proteinbanden im Immunoblot

Für die Quantifizierung von Proteinbanden aus Immunoblot Analysen wurde die „Multi Gauge V3.12 Software“ der Firma FujiFilm Europe (Düsseldorf) verwendet. Die Voraussetzung dafür ist die Verwendung des „Luminescent Image Analyser LAS~4000“ (5.4.8).

#### 4.4.10 *In vitro*-Proteasetest

Der *in vitro*-Proteasetest wurde zunächst unter Verwendung von Wildtyp- und Mutantenzellextrakt und später mit gereinigtem PopC Protein durchgeführt.

Für den *in vitro*-Proteasetest unter Verwendung von *M. xanthus* Zellextrakt (Lobedanz & Sogaard-Andersen, 2003) wurden Zellen für 9 h auf TPM-Agarplatten inkubiert, so dass der Entwicklungszyklus eingeleitet wurde (5.2.5). Danach wurden die Zellen von der Platte abgenommen und auf eine Dichte von  $5 \times 10^{10}$  Zellen pro ml in A50 Puffer (10 mM MOPS; 1 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 1 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 50 mM NaCl; pH 7,2) resuspendiert. Dann wurden die Zellen per

Ultraschall aufgeschlossen (5.4.2), so dass ein Zellextrakt vorliegt. 3,75 µg Protein dieses Zellextraktes wurden in die Reaktion mit einem Gesamtvolumen von 25 µl eingesetzt. MalE-p25 wurde in einer Endkonzentration von 2,5 µM in A50 Puffer zur Reaktion hinzugegeben. Die Reaktion erfolgte für 2 h auf Eis. Danach wurde diese durch die Zugabe von 2x SDS-Probenpuffer gestoppt, der Ansatz für 5 Min bei 95°C gekocht und in flüssigem Stickstoff gefroren. Später wurden die Proteine über ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (5.4.7) und per Immunoblot Analyse (5.4.8) untersucht.

Beim *in vitro*-Proteasetest mit gereinigtem PopC (Rolbetzki *et al.*, 2008) wurde 6,0 µg Protein in eine Reaktion mit einem Gesamtvolumen von 25 µl eingesetzt. Die Proteine befanden sich im A50MC Puffer (10 mM MOPS; 5 mM CaCl<sub>2</sub>; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 50 mM NaCl; pH 7,2), welcher auch für den Reaktionsansatz verwendet wurde. Die Endkonzentration von 2,5 µM MalE-p25 wurde beibehalten. Die Inkubation der Reaktion erfolgte für 24 h bei 32°C. Danach wurde die Reaktion durch die Zugabe von 2x SDS-Probenpuffer gestoppt, der Ansatz für 5 Min bei 95°C erhitzt und in flüssigem Stickstoff gefroren. Die Analyse erfolgte über eine SDS-PAGE (5.4.7) und per Immunoblot Analyse (5.4.8).

#### **4.4.11 Cell shaving**

Um Proteine der Zelloberfläche von *M. xanthus* zu verdauen, wurden intakte Zellen mit der unspezifischen Protease Proteinase K (PK) behandelt. Der proteolytische Abbau des zu untersuchenden Proteins wurde im Vergleich zum Abbau von Kontrollproteinen durch Immunoblot Analysen detektiert.

Für die Untersuchung in vegetativen *M. xanthus* Zellen wurden diese in 1% CTT-Medium (Tabelle 4) bis zu einer OD<sub>550</sub> von 0,6 bis 0,9 kultiviert und je 1 ml dieser Kultur in Reaktionsgefäße aliquotiert. Anschließend wurde den Aliquots das entsprechende Volumen der PK-Stammlösung (20 mg PK in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0) hinzugefügt, um die gewünschte PK Endkonzentration zu erreichen. PK wurde von der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen. Die Zellen wurden bei 32°C im Thermomixer der Firma Eppendorf (Hamburg) für die gewünschte Zeit inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde die Reaktion durch Inhibition der PK mit Zugabe von 100 µl der Protease Inhibitorlösung 1



(1 Tablette „complete Mini-Protease inhibitor cocktail tablets“ der Firma Roche (Mannheim) in 1 ml 1% CTT-Medium) gestoppt. Im Folgenden wurden die Proben auf Eis gekühlt. Die Zellen wurden für 5 Min bei 4°C und 13000 rpm pelletiert und das Zellpellet in flüssigem Stickstoff gefroren und bis zum Waschschrift bei -20°C gelagert. Für den Waschschrift wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und in 1 ml Protease Inhibitorlösung 2 (1 Tablette „complete Mini-Protease inhibitor cocktail tablets“ von Roche (Mannheim) in 10 ml 1% CTT-Medium) gewaschen. Das Pellet wurde in einem entsprechendem Volumen 1x SDS-Probenpuffer mit Protease Inhibitoren (1 Tablette „complete Mini-Protease inhibitor cocktail tablets“ von Roche (Mannheim) in 1 ml 1x SDS-Puffer) resuspendiert und für 5 min bei 95°C aufgeköcht. Dann wurden die Proben in einer SDS-PAGE aufgetrennt (5.4.7) und das zu untersuchende Protein mittels Immunoblot Analyse detektiert (5.4.8).

Für die Untersuchung von *M. xanthus* Zellen während des Entwicklungszyklus wurden diese in MC7-Medium (5.2.5) kultiviert, so dass sie in den Hungerzustand versetzt wurden. Des Weiteren erfolgte das Protokoll wie bei der PK-Behandlung der vegetativen Zellen. Die Reaktionen und Ansätze wurden jedoch stets in MC7-Puffer statt in CTT-Medium durchgeführt.

#### **4.4.12 Proteinanalyse durch Massenspektrometrie**

Die „Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation – Time Of Flight (MALDI-TOF)-MS“ Analysen von Proteinen wurden von Jörg Kahnt in der Abteilung Ökophysiologie des MPI Marburg durchgeführt.

Die Proteinproben wurden extrahiert und anschließend mit Trypsin verdaut. Dafür wurden die Gelregionen aus dem SDS-Gel ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß gegeben. Die Gelstücke wurden zum Umpuffern und Entfärben mit 1 ml Lösung 1 (20 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ; 50% Acetonitril; 4 mM DTT) inkubiert und gegebenenfalls wurde die überstehende Lösung gewechselt, bis die Färbung vollständig entfernt war. Nach dem Entfärben folgte das Trocknen der Gelstücke in der SpeedVac SC110 der Firma ThermoFisher Scientific (Bremen), nachdem diese für 1 h in 100% Acetonitril geschüttelt und das Acetonitril danach abgesaugt wurde. Die trockenen Gelstücke wurden mit einer frischen Lösung von 0,013 µg Trypsin (Promega, Madison, WI, USA) in

Lösung 2 (5 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ; 10% Acetonitril; 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) versetzt. Dieser Ansatz inkubierte mehrere Stunden bzw. über Nacht bei RT. Der Verlauf des Verdaus wurde parallel am MALDI-TOF verfolgt. Der Verdau wurde mit der Zugabe von 2  $\mu\text{l}$  10% Trifluoressigsäure gestoppt und war damit in einem saurem pH-Bereich, so dass der Ansatz für die Analyse per NanoLC (UltiMate® 3000 der Firma Dionex, USA) weiterverwendet werden konnte.

Für die Massenspektrometrie der charakteristischen Peptidmassen wurde der „4800Plus MALDI-TOF/TOF mass spectrometer“ (Tabelle 1) verwendet. Dafür wurde 1  $\mu\text{l}$  der aus dem Gel extrahierte Probe mit 1  $\mu\text{l}$  der Matrix (Cyano-4-hydroxymethylsäure in 70% Acetonitril, 0,1% Trifluoressigsäure) vermischt, getrocknet und im MALDI-TOF/TOF analysiert. Die Auswertung erfolgte durch die „GPS Explorer™ Software“ von Applied Biosystems (Darmstadt). Anhand spezifischer Massen („Peptidmass-Fingerprint“) konnte ein Vergleich mit einem theoretischen Verdau mit Hilfe der MASCOT-Software (Matrix Science, Boston) durchgeführt werden.

Die massenspektrometrische Analyse der synthetischen Peptide erfolgte in mehreren Ansätzen, die in Tabelle 19 dargestellt sind.

**Tabelle 19: Reaktionsansätze zur Untersuchung der synthetischen Peptide 1 und 2.**

<b>Ansatz</b>	
PopC	1 $\mu\text{l}$ PopC (3,4 g/l) + 10 $\mu\text{l}$ $\text{H}_2\text{O}$ + 3 $\mu\text{l}$ 1 M Tris, pH 7,6
PopC <sup>S423A</sup>	1 $\mu\text{l}$ PopC <sup>S423A</sup> (3,4 g/l) + 10 $\mu\text{l}$ $\text{H}_2\text{O}$ + 3 $\mu\text{l}$ 1 M Tris, pH 7,6
Peptid 1	5 $\mu\text{l}$ Peptid 1 Lösung + 10 $\mu\text{l}$ $\text{H}_2\text{O}$ + 3 $\mu\text{l}$ 1 M Tris, pH 7,6 + 1 $\mu\text{l}$ 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$
Peptid 1 + PopC	1 $\mu\text{l}$ PopC (3,4 g/l) + 5 $\mu\text{l}$ Peptid 1 Lösung + 5 $\mu\text{l}$ $\text{H}_2\text{O}$ + 3 $\mu\text{l}$ 1 M Tris, pH 7,6 + 1 $\mu\text{l}$ 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$
Peptid 1 + PopC <sup>S423A</sup>	1 $\mu\text{l}$ PopC <sup>S423A</sup> (3,4 g/l) + 5 $\mu\text{l}$ Peptid 1 Lösung + 5 $\mu\text{l}$ $\text{H}_2\text{O}$ + 3 $\mu\text{l}$ 1 M Tris, pH 7,6 + 1 $\mu\text{l}$ 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$
Peptid 2	5 $\mu\text{l}$ Peptid 2 Lösung. + 10 $\mu\text{l}$ $\text{H}_2\text{O}$ + 3 $\mu\text{l}$ 1 M Tris, pH 7,6 + 1 $\mu\text{l}$ 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$
Peptid 2 + PopC	1 $\mu\text{l}$ PopC (3,4 g/l) + 5 $\mu\text{l}$ Peptid 2 Lösung + 5 $\mu\text{l}$ $\text{H}_2\text{O}$ + 3 $\mu\text{l}$ 1 M Tris, pH 7,6 + 1 $\mu\text{l}$ 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$
Peptid 2 + PopC <sup>S423A</sup>	1 $\mu\text{l}$ PopC <sup>S423A</sup> (3,4 g/l) + 5 $\mu\text{l}$ Peptid 2 Lösung + 5 $\mu\text{l}$ $\text{H}_2\text{O}$ + 3 $\mu\text{l}$ 1 M Tris, pH 7,6 + 1 $\mu\text{l}$ 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$

Das Peptid 1 bestand aus 25 Aminosäuren, die mit den Aminosäuren 52-76 aus p25 übereinstimmen. Dieses Peptid wurde bei der Firma Coring

System Diagnostix GmbH (Gernsheim) in Auftrag gegeben. Das Peptid 2 bestand aus 52 Aminosäuren und wurde von der Firma PANATecx GmbH (Tübingen) synthetisiert. Für die Analyse wurden beide Peptide jeweils mit dem gereinigten PopC bzw. PopC<sup>S423A</sup> inkubiert. Tabelle 19 enthält die Reaktionsansätze für die Analyse der Spaltprodukte der synthetischen Peptide nach der Inkubation mit PopC bzw. PopC<sup>S423A</sup>. Diese Ansätze wurden für 24 h bei RT inkubiert und per MALDI-TOF/TOF analysiert.

#### 4.4.13 Analyse von Sequenzen

Protein- oder DNA-Sequenzen wurden online über Datenbanken von TIGR (<http://www.tigr.org/cmr>) bzw. NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) gesucht.

Für die Analyse und den Vergleich verschiedener Protein- und DNA-Sequenzen und für die Erstellung von verschiedensten Alignments wurde das Programm „Vector NTI Advance 11“ der Firma Invitrogen (Karlsruhe) verwendet. Dieses Programm diente des Weiteren dazu Sequenzen in einer persönlichen Datenbank zu archivieren, Klonierungen zu planen und Chromatogramme nach DNA-Sequenzierungen auszuwerten.

#### 4.4.14 Erstellung des Homologiemodells von p25

Homologiemodelle wurden mit Hilfe folgender Datenbanken bzw. Software erstellt: „RCSB PDB Protein Data Bank“ (<http://www.rcsb.org>); „Multiple Sequence Alignment by CLUSTALW“ (<http://align.genome.jp>); „SWISS-MODEL“ (<http://swissmodel.expasy.org>) und „PyMOL v0.99“.

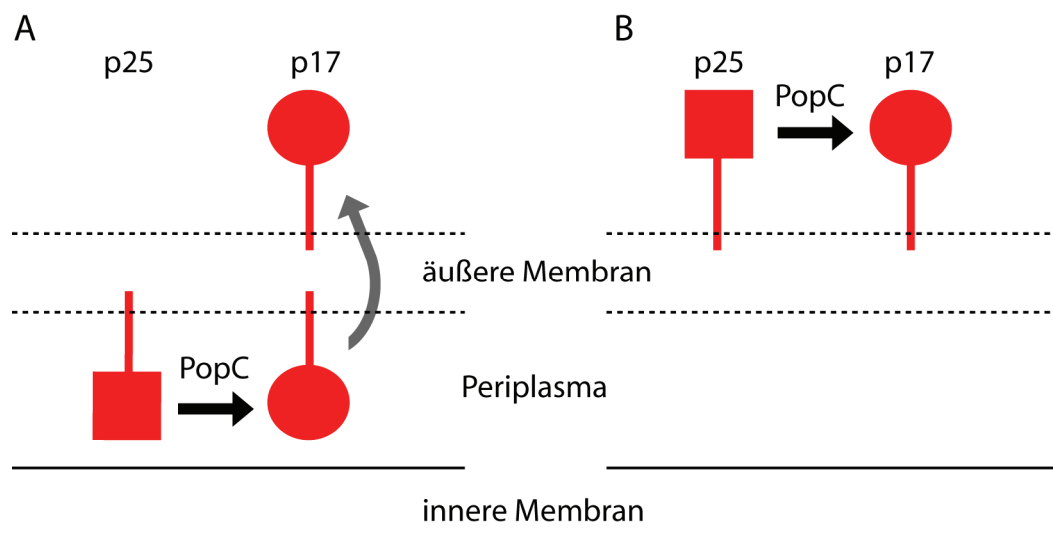
In der „RCSB PDB Protein Data Bank“ wurde nach der Kristallstruktur eines Proteins gesucht, das hohe Homologien zu dem Zielprotein ausweist (für p25: *Carbonyl reductase Sniffer* von *D. melanogaster*). Mit der Sequenz dieses Proteins wurde über „Multiple Sequence Alignment by CLUSTALW“ (<http://align.genome.jp>) ein Alignment mit der Sequenz des Zielproteins erstellt. Dieses Alignment wurde dann auf der Seite „SWISS-MODEL“ (<http://swissmodel.expasy.org>) in einem Strukturmodell vereinigt. Dieses

Strukturmodel wurde dann über die „PyMOL v0.99“-Software in Bezug auf Farbgebung, Benennung von Aminosäuren usw. weiter bearbeitet

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Zelluläre Lokalisation von p25

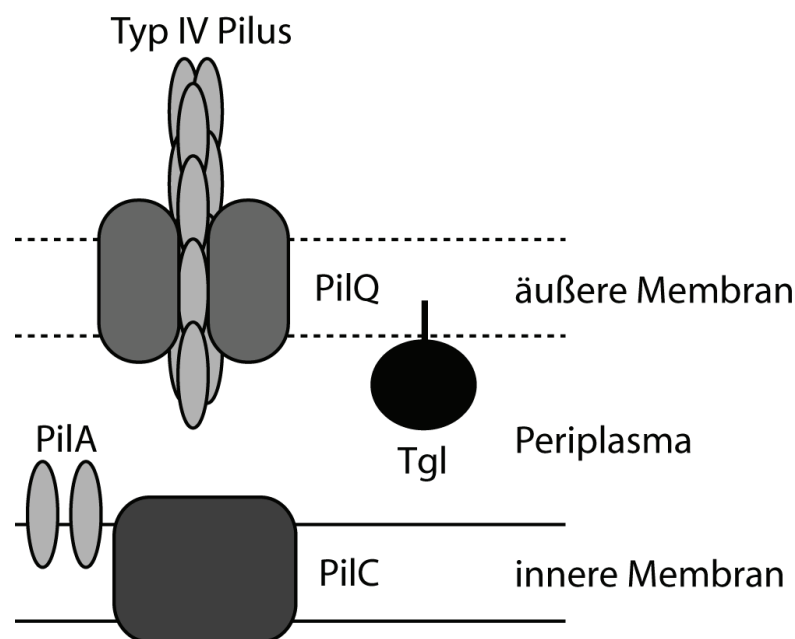
Für die zelluläre Lokalisation von p25 sind zwei verschiedene Modelle denkbar (Abbildung 7). Da durch Zellfraktionierungen gezeigt werden konnte, dass sich p25 in der äußeren Membran befindet (Lobedanz & Sogaard-Andersen, 2003), stellt sich die Frage, ob p25 auf der Zelloberfläche oder ins Periplasma exponiert ist. Das erste Modell in Abbildung 7A zeigt, dass p25 ins Periplasma gerichtet ist und dort von der Protease PopC in p17 prozessiert wird. Danach würde es zu einer Änderung der Ausrichtung von p17 vom Periplasma auf die Zelloberfläche kommen. Des Weiteren wäre ein zweites Modell denkbar, bei dem sowohl p25 als auch p17 auf der Zelloberfläche exponiert sind, an der p25 nach der Sekretion von PopC in p17 gespalten werden kann (Abbildung 7B).



**Abbildung 7: Zwei verschiedene Modelle zur zellulären Lokalisation von p25.** **A:** p25 ragt in den periplasmatischen Raum. p17 wird von PopC im Periplasma geschnitten und auf die Zelloberfläche transportiert. **B:** p25 und p17 sind auf der Zelloberfläche lokalisiert, wo die sekretierte Protease PopC p25 in p17 spalten kann.

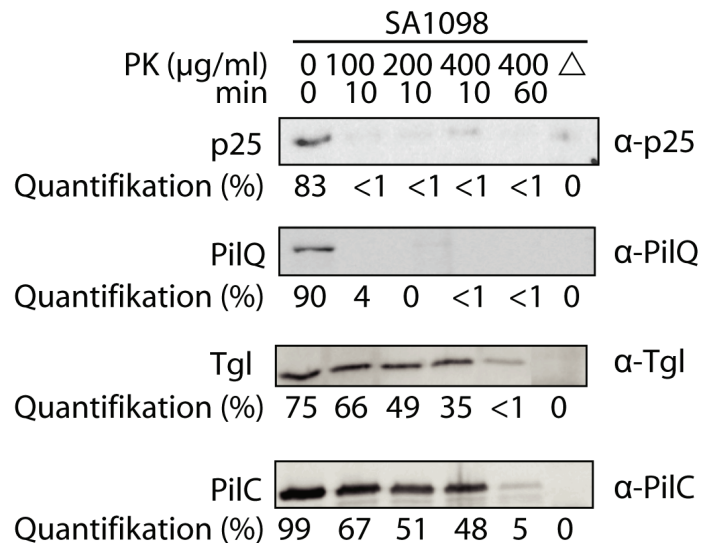
Ist p25 auf der Zelloberfläche exponiert, sollte es durch eine von außen zugegebene unspezifischen Protease, wie z.B. Proteinase K (PK), auf den intakten Zellen abgebaut werden. Ragt p25 stattdessen ins Periplasma, würde es nicht degradiert werden. Vor diesem Hintergrund wurden *Cell shaving* Experimente durchgeführt. Immunoblot Analysen mit spezifischen Antikörpern sollten Aufschluss über die Degradation von verschiedenen Kontrollproteinen

und p25 in vegetativen Zellen geben. Die verwendeten Kontrollproteine sind Komponenten des Type 4 Pilus in *M. xanthus* (Abbildung 8). Wird p25 in ähnlicher Weise abgebaut wie Proteine der äußeren Membran, die auf der Zelloberfläche exponiert sind, deutet dies darauf hin, dass sich auch p25 auf der Zelloberfläche befindet. PilQ wird als ein Vertreter von Äußeren Membran-Proteinen herangezogen, der Proteinbereiche auf der Zelloberfläche ausgerichtet hat. Für den Type 4 Pilus bildet PilQ einen multimeren Kanal in der äußeren Membran (Nudleman *et al.*, 2006; Wall *et al.*, 1999). Bei den *Cell shaving* Experimenten wird PilQ zum einen eingesetzt, um die Effizienz des PK Verdaus zu kontrollieren und zum anderen um PilQ mit p25 in Bezug auf den Proteaseverdau zu vergleichen. Sollte p25 nicht in der gleicher Weise wie PilQ abgebaut werden, bleibt die Frage offen, ob p25 ins Periplasma gerichtet ist. Um dies zu untersuchen, wird das Lipoprotein Tgl eingesetzt, ein Protein der äußeren Membran, welches sich in den periplasmatischen Raum erstreckt (Rodriguez-Soto & Kaiser, 1997). PilC ist ein Protein der inneren Membran (Bulyha *et al.*, 2009). Es dient dem Nachweis, dass der Abbau von Proteinen spezifisch dem Proteaseverdau und nicht der Lyse von Zellen zuzuordnen ist. Des Weiteren kann mit Hilfe von PilC und Tgl ausgeschlossen werden, dass PK die äußere Membran penetriert und dadurch ins Periplasma gelangt.



**Abbildung 8: Proteine des Typ 4 Pilus als Kontrollproteine für *Cell shaving* Experimente.** PilQ ist in der äußeren Membran lokalisiert und ragt auf die Zelloberfläche. Tgl ist ein Lipoprotein der äußeren Membran, das ins Periplasma ragt. PilC ist ein Protein der inneren Membran.

Für das *Cell shaving* Experiment (5.4.11) wurden *M. xanthus* Zellen in Nährmedium kultiviert und die aliquotierten Bakterienkulturen mit verschiedenen PK Konzentrationen für 10 und 60 Min inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von Proteaseinhibitoren gestoppt, die Zellen in SDS-Probenpuffer aufgenommen und per SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurden Immunoblot Analysen mit entsprechenden Antikörpern (p25, PilQ, Tgl, PilC) durchgeführt (Abbildung 9).

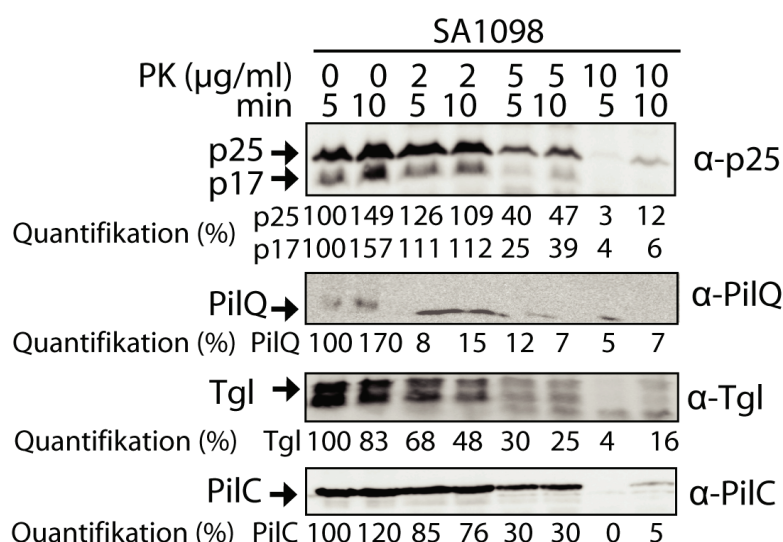


**Abbildung 9: p25 wird vergleichbar mit PilQ durch Proteinase K abgebaut.** *M. xanthus* Zellen wurden nach dem *Cell shaving* über eine 16% bzw. 8% SDS-PAGE (für den Nachweis von PilQ) aufgetrennt und per Immunoblot analysiert. Die verwendeten Antikörper waren spezifisch gegen p25, PilQ, Tgl und PilC (Tabelle 18). Die Quantifizierungen wurden mit der „Multi Gauge V3.12“ Software der Firma FujiFilm durchgeführt.

Die Immunoblot Analysen zeigen, dass p25 und PilQ in gleichem Maße bei geringen PK Konzentrationen abgebaut werden (Abbildung 9). Dies wird durch die Quantifizierung bestätigt. Die Proteinkonzentrationen von Tgl und PilC bleiben bis zu einer PK Konzentration von 400 µg/ml bei 10 minütiger Inkubation relativ stabil. Die Quantifizierung zeigt für Tgl und PilC jeweils einen 2-fachen Abbau der Proteine. Bei einer längeren Inkubation der Zellen mit 400 µg/ml PK für 60 Min nehmen Tgl und PilC in ihrer Konzentration ab. Hier wird der vollständige Abbau durch die Quantifizierung bestätigt. Da nur ein geringer Abbau von Tgl im Vergleich zu p25 und PilQ erfolgt, deutet dieses Ergebnis darauf hin, dass p25 nicht ins Periplasma ragt. Damit kann außerdem ausgeschlossen werden, dass PK in den periplasmatischen Raum gelangt. Da die Degradation von PilC im Gegensatz zu p25 und PilQ gering ist, deutet dies

auf eine minimale Zelllyse hin. PilC bleibt nur bis zu einer bestimmten Proteasekonzentration gegenüber dem Abbau durch PK relativ stabil. Daher kann sicher gestellt werden, dass es sich bei PilC um eine geeignete Zelllyse-Kontrolle handelt. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass p25 auf der Zelloberfläche von *M. xanthus* exponiert ist. Demnach ist das zweite Modell wahrscheinlich, in dem p25 nach der Sekretion von PopC auf der Zelloberfläche in p17 gespalten wird.

Zur Untersuchung der zellulären Lokalisation von p17 sollte das *Cell shaving* Experiment an hungernden Zellen durchgeführt werden (5.4.11). Dabei wurden *M. xanthus* Zellen für 7 Stunden in Minimalmedium MC7 in den Hungerzustand gebracht und dann, wie die vegetativen Zellen, mit PK behandelt (Abbildung 10).



**Abbildung 10: Cell shaving Experiment mit hungernden Zellen.** *M. xanthus* Zellen wurden für 7 Stunden in MC7 Medium dem Hungerzustand ausgesetzt und dann mit PK behandelt. Die Proben wurden für die Immunoblot Analyse über eine 16% bzw. 8% SDS-PAGE (für den Nachweis von PilQ) aufgetrennt. Die verwendeten Antikörper waren α-p25, α-PilC, α-PilQ und α-Tgl (Tabelle 18). Die Quantifizierungen wurden mit der „Multi Gauge V3.12“ Software der Firma FujiFilm, die zum Luminescent Image Analyser LAS~4000“ gehört, durchgeführt.

Der deutlichste Unterschied zu der Behandlung der vegetativen Zellen war die erforderliche bis zu 100-fache Reduzierung der PK Konzentration, um eine generelle Zelllyse zu verhindern. Die Immunoblot Analysen zeigen, dass die Proteinkonzentrationen von p25, p17, Tgl und PilC bis zu einer PK Konzentration von 5µg/ml vergleichbar beständig bleiben (Abbildung 10). Dies wird durch die Quantifizierung der Proteinsignale bestätigt. Einzig PilQ zeigt



einen rapiden Abbau bei 2 µg/ml PK. Dabei ist die Konzentration von PilQ in der Kontrolle bei den hungernden Zellen im Gegensatz zu vegetativen Zellen generell reduziert (Abbildung 9). Bei einer PK Konzentration von 5 µg/ml kommt es zu einer vergleichbaren Abnahme der Proteinkonzentration von p25, p17, Tgl und PilC. Bei 10 µg/ml PK ist ein vollständiger Abbau der Proteine zu sehen. Da auch PilC abgebaut ist, ist eine Zelllyse bei dieser PK Konzentration wahrscheinlich. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass hungernden *M. xanthus* Zellen fragiler sind als vegetative Zellen. Daher war es nicht möglich optimale Bedingungen für die Behandlung der hungernden Zellen zu finden. Entweder war die PK Konzentration zu gering, so dass kein Effekt zu beobachten war oder die Konzentration war zu hoch, so dass die Zellen lysierten. Es wurden verschiedene Konditionen getestet. Es war jedoch nicht möglich, Bedingungen zu finden, die ein aussagekräftiges Ergebnis in hungernden Zellen lieferten.

## 5.2 Spaltstelle von PopC in p25

Das C-Signalvorläuferprotein p25 wird von der Subtilisin-Protease PopC proteolytisch gespalten, um das C-Signal p17 zu generieren (Rolbetzki *et al.*, 2008). p17 stimmt dabei mit dem C-terminalen Teil von p25 überein (Lobedanz & Sogaard-Andersen, 2003). Die genaue Spaltstelle ist jedoch nicht bekannt. Von der abgeschätzten molekularen Masse von p17 im SDS-Gel wird die Spaltstelle in p25 zwischen den Aminosäuren 60-68 in p25 vermutet und als potentielle PopC-Spaltstelle bezeichnet (Lobedanz & Sogaard-Andersen, 2003). Im Zuge dieser Arbeit sollte die exakte PopC-Spaltstelle identifiziert und somit der N-Terminus von p17 determiniert werden. Die Analysen zur Bestimmung der tatsächlichen PopC-Spaltstelle wurden von der potentiellen PopC-Spaltstelle ausgehend begonnen (Abbildung 11).

### p25

```

MRYVITGASRGIGFEFVQQLLRGDTVEAGVRSPEGARRLEPLKQKAGNR 50
LRIHALDVGDDDSVRSFATNVCTGPVDVLINNAGVSGLWCALGDVDYADM 100
ARTFTINALGPLRVTSAMLPLRQ GALRRVAHVTSRMGSLAANTDGGAYA 150
YRMSKAALNMAVRSMSTD LRPEGFVTVLLHPGWVQ TDMGGPDATLPAPDS 200
VRGMLRVIDGLNPEHSGRFFDYQGTEVPW 229
  
```

**Abbildung 11: Aminosäuresequenz von p25.** Der N-Terminus von p25 ist in rot markiert, während der C-Terminus, der p17 entspricht, blau dargestellt wird. Die graue Farbe hebt die potentielle PopC-Spaltstelle (Aminosäuren 60-68) hervor.

Um die PopC-Spaltstelle aufzuklären, wurden sowohl biochemische als auch genetische Strategien gewählt:

- Synthetische Peptide zur Detektion der PopC-Spaltstelle in p25 über die Analyse der Spaltprodukte nach PopC Prozessierung (6.2.1).
- Massenspektrometrische Analysen von p17 zur Identifizierung der PopC-Spaltstelle (6.2.2).
- Verschiedene Deletionsderivate von p25 mit N-terminalem MalE-tag zur Eingrenzung der PopC-Spaltstelle (6.2.3).
- Analyse der Relevanz einzelner Aminosäuren in Bezug auf die PopC-Spaltung durch Alaninsubstitutionen (6.2.4, 6.2.5).

### 5.2.1 Identifikation der PopC-Spaltstelle unter Verwendung synthetischer Peptide

Um die PopC-Spaltstelle zu identifizieren, wurden zwei synthetische Peptide verwendet. Diese Peptide, die die potentielle PopC-Spaltstelle von p25 enthalten, wurden jeweils mit gereinigtem PopC<sup>WT</sup> inkubiert, um das Peptid am PopC-Spaltmotiv zu prozessieren. Die Spaltprodukte wurden dann mittels Massenspektrometrie analysiert, um Rückschlüsse auf die PopC-Spaltstelle ziehen zu können. Als Kontrolle erfolgte eine Inkubation der Peptide mit gereinigtem PopC<sup>S423A</sup> Protein. PopC<sup>S423A</sup> trägt die Substitution S423A in der katalytischen Triade von PopC, die dieses Protein inaktiv macht (Rolbetzki *et al.*, 2008).

A

p25

```

MRYVITGASRGIGFEFVQQLLLRGDTVEAGVRSPEGARRLEPLKQKAGNR 50
LRIHALDVGDDDSVRAFATNVCTGPVDVLINNAGVSGLWCALGDVDYADM 100
ARTFTINALGPLRVTSAMLPGLRQGALRRVAHVTSRMGSLAANTDGGAYA 150
YRMSKAALNMAVRSMSTDRLRPEGFVTVLLHPGWVQTDMGGPDATLPAPDS 200
VRGMLRVIDGLNPEHSGRFFDYQGTEVPW 229
  
```

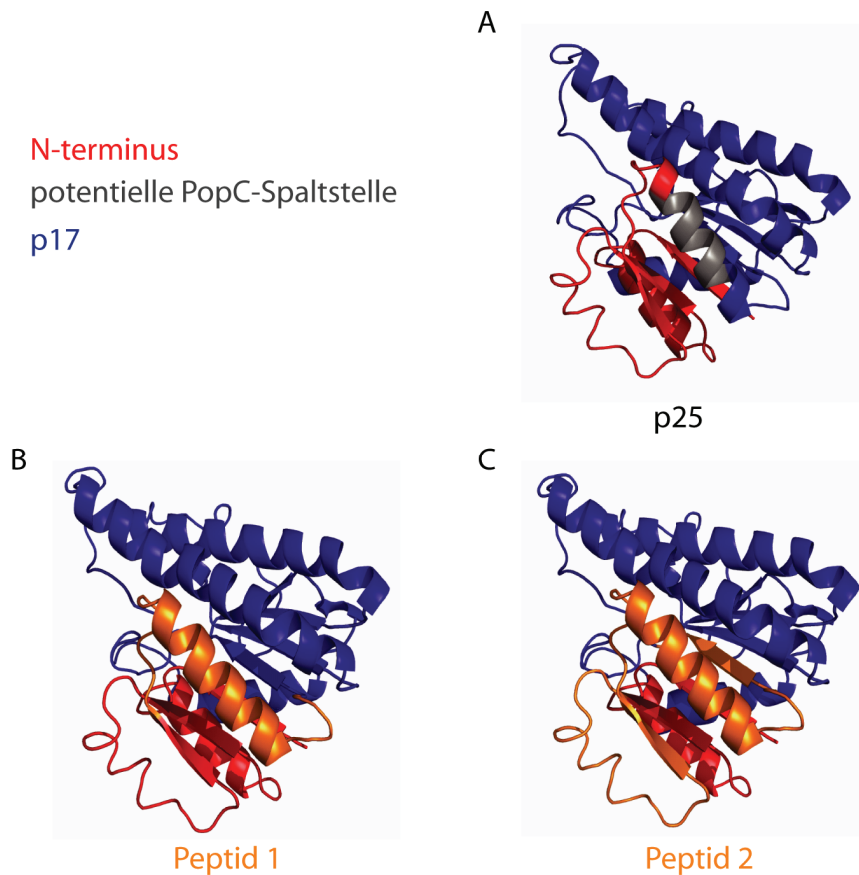
B

Peptid 1 NH2-RIHALDVGDDDSVRAFATNVCTGPV-COOH

Peptid 2 NH2-VRSPEGARRLEPLKQKAGNRLRIHALDVGDDDSVRAFATNVCTGPVDVLINN-COOH

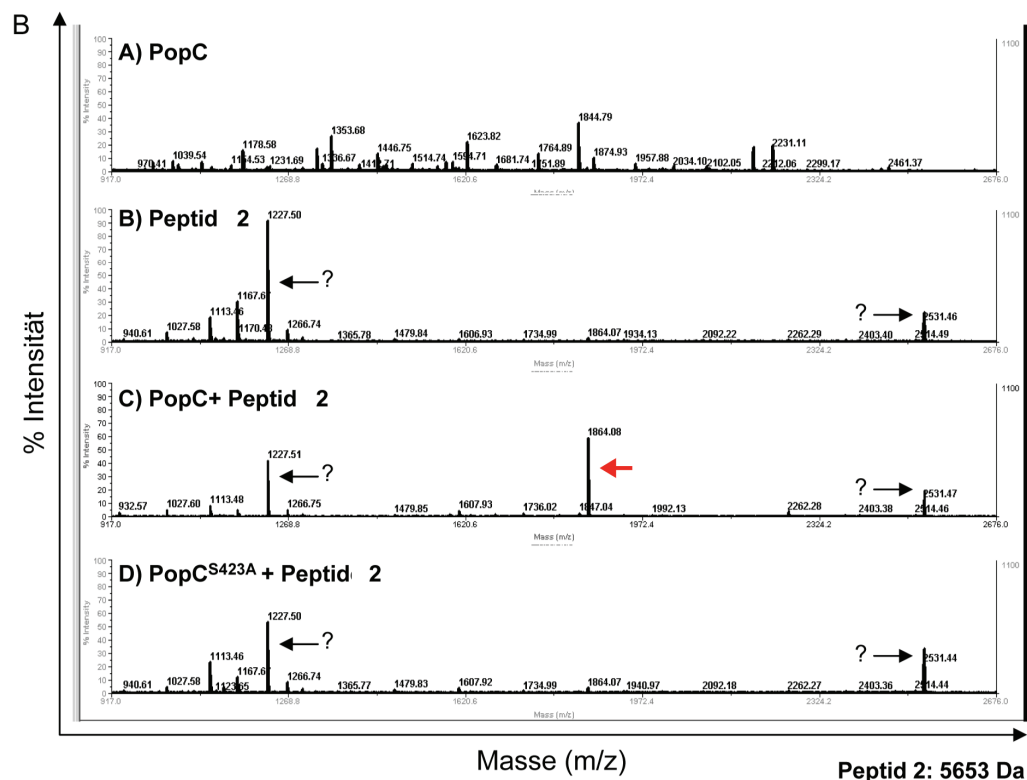
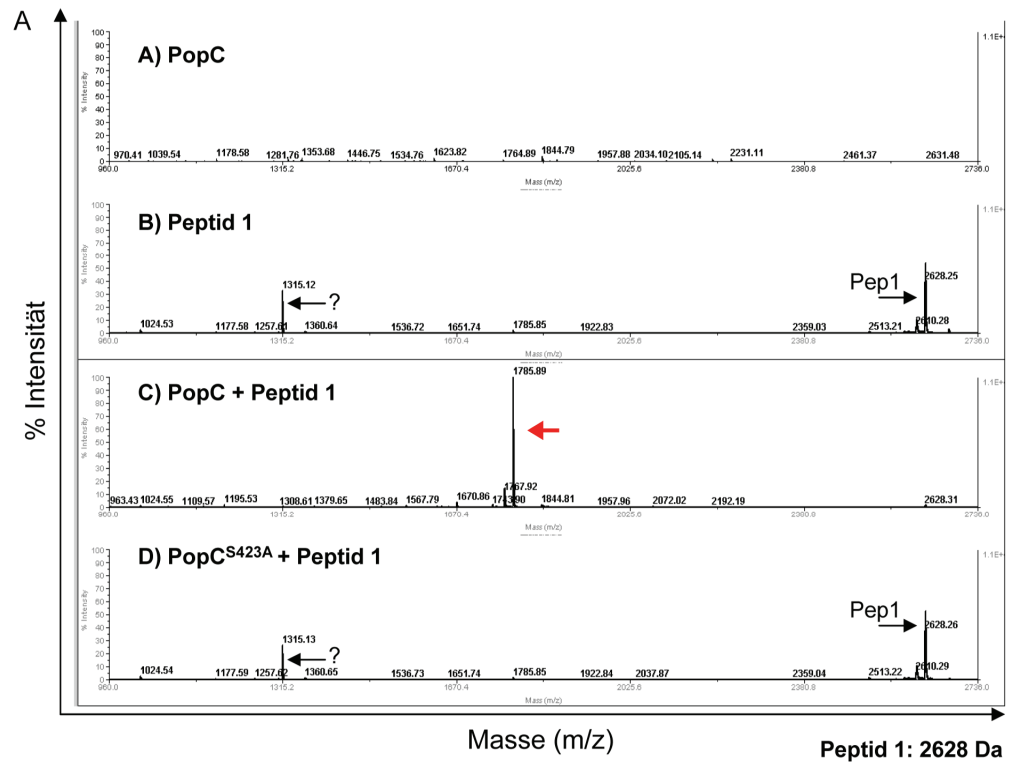
**Abbildung 12: Aminosäuresequenz der synthetischen Peptide Peptid 1 und Peptid 2.**  
**A:** Aminosäuresequenz von p25. Der N-Terminus von p25 ist in rot markiert, die potentielle PopC-Spaltstelle in grau und der C-Terminus in blau. Die unterstrichenen Aminosäuren entsprechen den Aminosäuren der beiden synthetischen Peptide (Peptid 1: Aminosäuren 52-76; Peptid 2: Aminosäuren 31-82) **B:** Sequenzen der beiden synthetischen Peptide Peptid 1 und Peptid 2.

Das Peptid 1 besteht aus 25 Aminosäuren, die den Aminosäuren 52-76 aus p25 entsprechen. Das Peptid 2 umfasst 52 Aminosäuren mit zusätzlichen Aminosäuren am N- und C-Terminus von Peptid 1 (Abbildung 12). In der Abbildung 13 sind die Positionen der Peptide in einem Homologiemodell von p25 gezeigt (5.4.14). Dabei wird deutlich, dass die synthetischen Peptide homolog zu der  $\alpha$ -Helix Struktur sind, in der sich die potentielle PopC-Spaltstelle befindet.



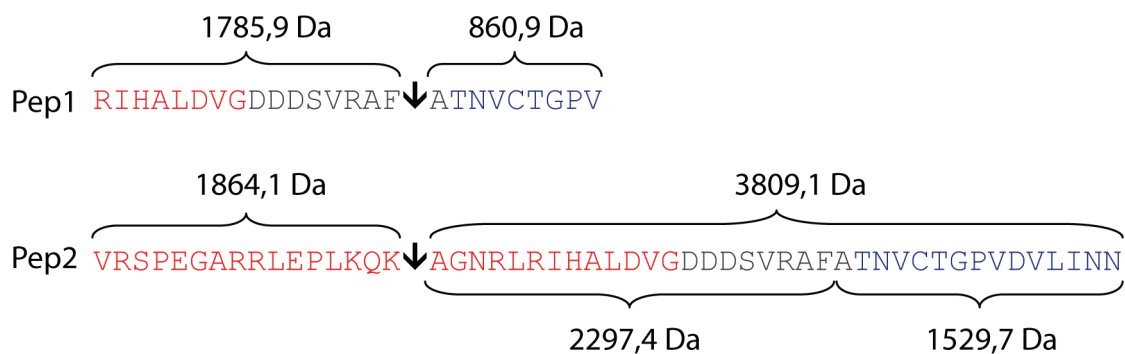
**Abbildung 13: Homologiemodell von p25 mit den Peptiden 1 und 2.** A: Das Modell von p25 basiert auf den Aminosäuren 4-229 des Carbonylreduktase-Sniffers aus *D. melanogaster*. Die Sequenzidentität liegt bei 34% und der E-Wert bei  $1,01 \times 10^{-29}$ . Die potentielle PopC-Spaltstelle (grau markiert) befindet sich nach dem Modell in einer  $\alpha$ -Helix Struktur. Das Peptid 1 (B) und das Peptid 2 (C) sind jeweils in orange dargestellt. Die Peptide erstrecken sich jeweils über die  $\alpha$ -Helix, die die potentielle PopC-Spaltstelle enthält.

Um die PopC-Spaltstelle zu identifizieren, wurden die entstehenden Spaltprodukte per Massenspektrometrie untersucht (5.4.12). Das Peptid 1 ergab ein spezifisches Spaltprodukt von 1785,9 Da (Abbildung 14A). Dieses Spaltprodukt entspricht einer Spaltung nach dem Aminosäuremotiv  $^{65}\text{RAF}^{67}$  in der Region der potentiellen PopC-Spaltstelle in p25. Das entsprechende Gegenstück des Spaltproduktes würde eine theoretische Masse von 860,9 Da ergeben und konnte nicht detektiert werden. Mit dem Peptid 2 wurde ein spezifisches Spaltprodukt von 1864,1 Da detektiert (Abbildung 14B). Diese Spaltung würde mit einer Spaltung nach dem Aminosäuremotiv  $^{44}\text{KQK}^{46}$  in p25 übereinstimmen. Das entsprechende Gegenstück des Spaltproduktes würde eine theoretische Masse von 3809,1 Da ergeben und konnte nicht detektiert werden.



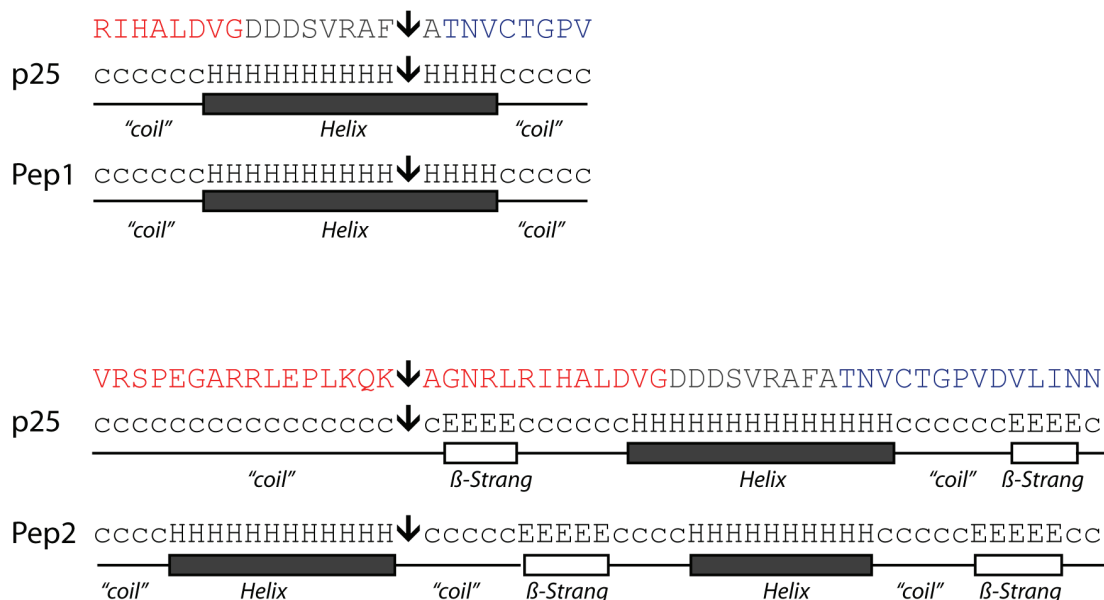
**Abbildung 14: Spaltprodukte nach Verdau der synthetischen Peptide mit PopC<sup>WT</sup> bzw. PopC<sup>S423A</sup>.** Beide Peptide wurden jeweils mit gereinigtem PopC<sup>WT</sup> und PopC<sup>S423A</sup> für 24 h bei RT inkubiert. Die Proben wurden per Massenspektrometrie analysiert. Der rote Pfeil markiert jeweils das entstandene Spaltprodukt nach dem PopC Verdau. **A:** Peptid 1: Das Peptid 1 ist als Pep1 mit einem Pfeil markiert. **B:** Peptid 2: Das Peptid 2 ist mit 5653 Da in der unteren Abbildung nicht sichtbar. Die mit einem Fragezeichen markierten Peptide konnten der Masse nach nicht zugeordnet werden.

Peptid 2 enthält, wie Peptid 1, das Motiv  $^{65}\text{RAF}^{67}$ . Daher könnte das Peptid 2 theoretisch hinter diesem Motiv zusätzlich gespalten werden. Diese Prozessierung würde zu Peptiden mit 2297,4 Da und 1529,7 Da führen (Abbildung 15). Peptide dieser Masse konnten jedoch nicht detektiert werden (Abbildung 14).



**Abbildung 15: PopC-spezifische Spaltprodukte in Peptid 1 und 2.** Die molekularen Massen der Spaltprodukte, die per Massenspektrometrie detektiert wurden, entsprechen den Aminosäuresequenzen unterhalb der Klammern.

Um das Auftreten der zwei verschiedenen Spaltmotive bei den beiden Peptiden erklären zu können, wurde die vorhergesagte Sekundärstruktur der synthetischen Peptide mit der von p25 verglichen (Abbildung 16).



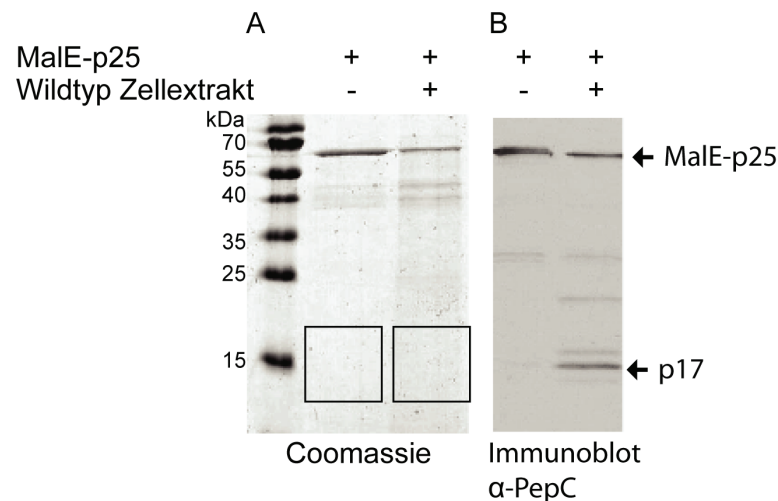
**Abbildung 16: Vorhersage der Sekundärstruktur der beiden synthetischen Peptide.** Die Sekundärstruktur der synthetischen Peptide wurde über den "PSIPRED Protein Structure Prediction Server" vorhergesagt. Die Sekundärstruktur ist wie folgt dargestellt: H= α-Helix, E= β-Faltblatt (β-Strang), c= unstrukturiert („coil“),  $\downarrow$ = Spaltung zwischen x↓x.

Die potentielle Sekundärstruktur des Peptid 1 ist vergleichbar mit der Sekundärstruktur von p25 (Abbildung 16). In beiden Fällen wird eine  $\alpha$ -Helix vorhergesagt. Im Gegensatz dazu weist die Vorhersage für das Peptid 2 eine zweite  $\alpha$ -Helix am N-Terminus des Peptids auf, die in p25 nicht vorliegt. Dies könnte darauf hinweisen, dass Peptid 2 aufgrund dieser zweiten  $\alpha$ -Helix von PopC gespalten wird und PopC demnach nicht nur ein Aminosäuresequenzmotiv, sondern auch eine  $\alpha$ -Helix Struktur zur spezifischen Spaltung benötigt.

### 5.2.2 Massenspektrometrische Analyse von p17 aus *E.coli*

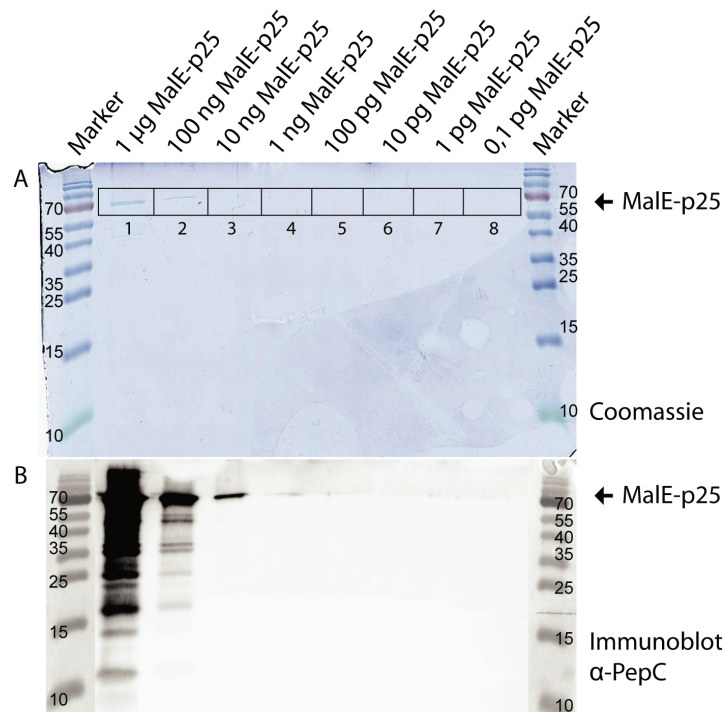
Im Vorfeld dieser Arbeit wurde versucht, p17 direkt aus *M. xanthus* zu reinigen (Weis, 2007). Dabei erfolgte die Reinigung mit leichten Modifikationen nach dem Protokoll zur Reinigung des C-Signals von Kim & Kaiser (Kim & Kaiser, 1990a). Obwohl die Reinigung erfolgreich war, d.h. p25 und p17 mittels Immunoblot Analyse in einzelnen Fraktionen nach der Reinigung nachweisbar waren, scheiterte der Versuch, p25 bzw. p17 durch Massenspektrometrie nachzuweisen. Es wurden ausschließlich Peptide detektiert, die nicht mit der Datenbank von *M. xanthus* übereinstimmten und so zu keinem positiven Ergebnis geführt haben. Der Versuch p17 aus *M. xanthus* zu identifizieren, führten somit zu keinem Ergebnis. Daher sollte p17 durch die Analyse von Spaltprodukten nach einer PopC-spezifischen Prozessierung von MalE-p25 aus *E. coli in vitro* bestimmt werden. Zwei Spaltprodukte wären danach zu erwarten: p17 und der verbleibende 8 kDa Rest des N-Terminus von p25 gebunden an den MalE-tag.

MalE-p25 wird von Wildtyp-Zellextrakt aus hungernden *M. xanthus* in p17 gespalten. In Immunoblot Analysen sind sowohl p17 als auch MalE-p25 detektierbar (Abbildung 17B). In einer SDS-PAGE, die mit Coomassie gefärbt wurde, ist nur MalE-p25, aber kein p17 erkennbar (Abbildung 17A). Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Menge an p17 sehr gering sein könnte und damit unter der Detektionsgrenze der Coomassie-Färbung liegt. Dennoch sollte es mit der hohen Sensitivität der Massenspektrometrie möglich sein, p17 nach der Extraktion aus der SDS-PAGE zu detektieren.



**Abbildung 17: p17 ist in Immunoblot Analysen detektierbar, jedoch nicht in einer Coomassie-gefärbten SDS-PAGE.** A: Ein mit Coomassie-gefärbtes SDS-Gel zeigt eine Proteinbande von MalE-p25. Die Kästen zeigen die Regionen an, die aus der SDS-PAGE ausgeschnitten, mit Trypsin verdaut und per Massenspektrometrie analysiert wurden. B: In einer Immunoblot Analyse können MalE-p25 und p17 detektiert werden.

Um zuvor die Sensitivität der Massenspektrometrie für p25 bzw. p17 zu bestimmen, wurden zwei verschiedene SDS-Gele benutzt, auf denen jeweils ein Proteingradient mit MalE-p25 aufgetragen wurde (1  $\mu$ g - 0,1 pg Protein) (Abbildung 18).



**Abbildung 18: Vergleich der Sensitivität zwischen Immunoblot Analyse und Massenspektrometrie.** MalE-p25 wurde auf je eine SDS-PAGE aufgetragen. Gel A wurde mit Coomassie gefärbt. Die Box markiert die Segmente, die ausgeschnitten, mit Trypsin verdaut und per Massenspektrometrie analysiert wurden. Die Nummern 1-8 kennzeichnen die analysierten Gelsegmente. Gel B wurde in einem Immunoblot analysiert.



Das eine SDS-Gel wurde mit Coomassie gefärbt und die einzelnen Gelsegmente, die die ansteigenden Proteinkonzentrationen enthielten, mittels Massenspektrometrie analysiert (Abbildung 18A). Das andere SDS-Gel wurde für eine Immunoblot Analyse benutzt und die Proteine mit Antikörpern gegen p25 detektiert (Abbildung 18B). Im Immunoblot war MalE-p25 in den ersten drei Gelspuren deutlich detektierbar, die den Gelsegmenten 1-3 entsprachen. Bei der Analyse per Massenspektrometrie konnte in den Gelsegmenten 1 und 2, die 1 µg und 100 ng MalE-p25 enthielten, jeweils 12 Peptide identifiziert werden (Abbildung 19A). Im Gelsegment 3, das eine Proteinmenge von 10 ng enthielt, waren 7 Peptide detektierbar, während im Gelsegment 4 (1 ng MalE-p25) noch 4 Peptide identifizierbar waren. In grün sind jene Peptide dargestellt, die in mindestens drei der Gelsegmente wiederkehrend bestimmt wurden.

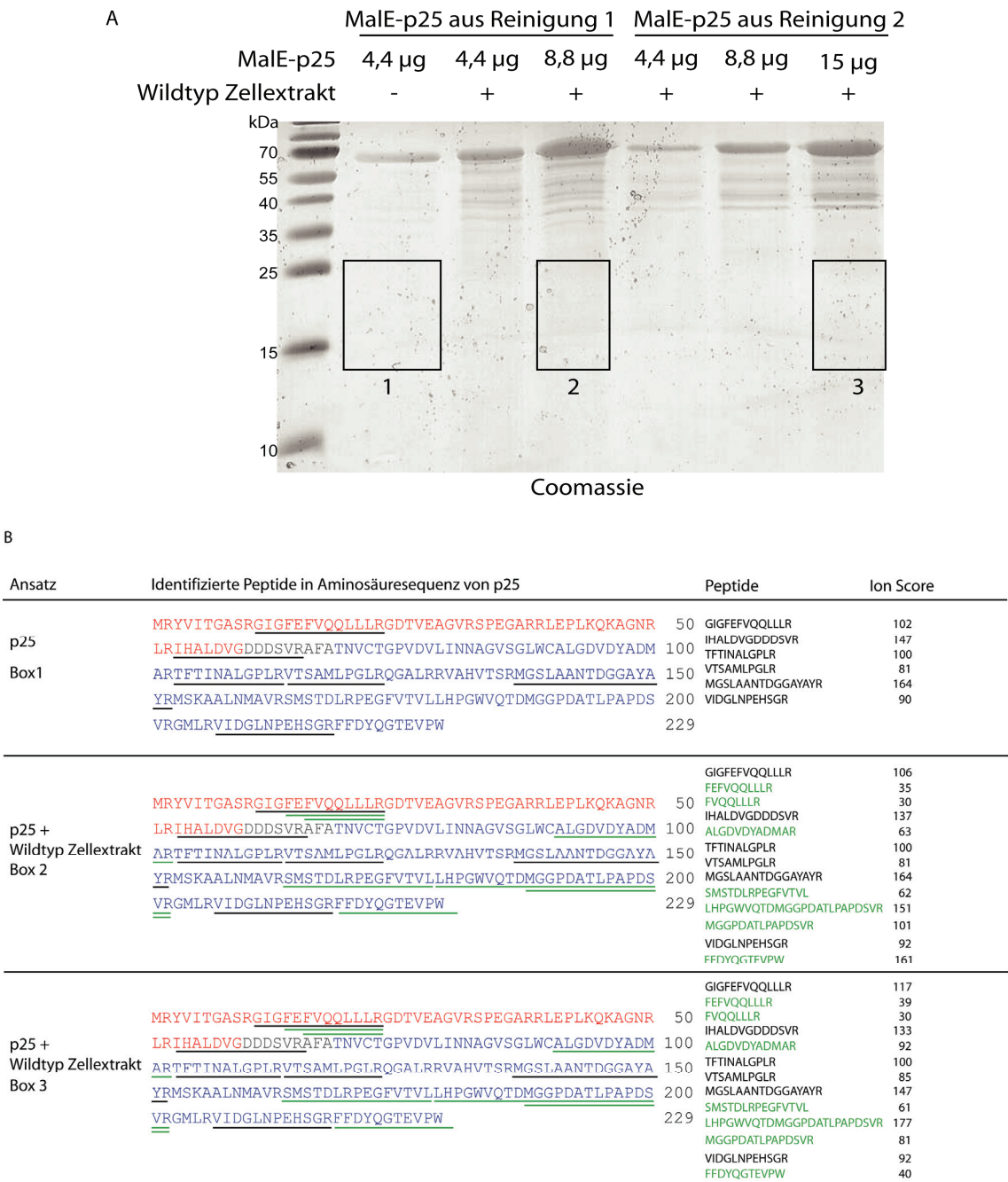
A	1 µg MalE-p25	100 ng MalE-p25	10 ng MalE-p25	1 ng MalE-p25
	YVITGASR.....	YVITGASR.....	YVITGASR.....	.....
	.....	GIGFEFVQQLLR.....	.....	GIGFEFVQQLLR
	.....	VQQLLR.....	.....	.....
	GDTVEAGVR.....	.....	.....	.....
	.....	.....	VEAGVRSPEGAR.....	.....
	IHALDVGDDDSVR.....	IHALDVGDDDSVR.....	IHALDVGDDDSVR.....	.....
	ALGDVDYADMAR.....	.....	.....	.....
	TFTINALGRLR.....	TFTINALGRLR.....	TFTINALGRLR.....	TFTINALGRLR.....
	VTSAMPLPGLR.....	VTSAMPLPGLR.....	VTSAMPLPGLR.....	.....
	MGSLAANTDGGAYAYR.....	MGSLAANTDGGAYAYR.....	MGSLAANTDGGAYAYR.....	.....
	AALNMAVR.....	AALNMAVR.....	.....	.....
	SMSTDLRPEGF.....	SMSTDLRPEGF.....	.....	.....
	SMSTDLRPEGFVTVL.....	SMSTDLRPEGFVTVL.....	.....	.....
	.....	MGGPDATLPAPDSVR.....	.....	.....
	.....	.....	.....	ATLPAPDSVR.....
	VIDGLNPEHSGR.....	VIDGLNPEHSGR.....	VIDGLNPEHSGR.....	VIDGLNPEHSGR.....
	FFDYQGTEVPW.....	.....	.....	.....
Sequenz- abdeckung	55%	53%	36%	20%
B	p25			
	MRYVITGASRGIGFEFVQQLLRGDTVEAGVRSPEGARRLEPLKQKAGNR 50			
	LR IHALDVGDDDSVR AFATNVCTGPVDVLINNAGVSGLWCALGDVDYADM 100			
	ARTFTINALGRLRVTSAMPLPGLRQALRRVAHVTSRMGSLAANTDGGAYA 150			
	YRMSKAALNMAVRSMSTDLRPEGFVTVLLHPGWVQTMGGPDATLPAPDS 200			
	VRGMLRVIDGLNPEHSGRFFDYQGTEVPW 229			

**Abbildung 19: Identifizierte Peptide von MalE-p25 nach Massenspektrometrie. A:** In den ersten 4 Gelsegmenten aus Abbildung 18A konnten die dargestellten Peptide identifiziert werden. Die grün markierten Peptide wurden in mindestens drei Proben gefunden. **B:** Die Positionen der Peptide sind in der Aminosäuresequenz von p25 unterstrichen. Die Farbgebung in grün und schwarz entspricht **A**.

Zusammenfassend kann man sagen, dass das Gelsegment 3 (10 ng MalE-p25) zum einen ein deutliches detektierbares Signal im Immunoblot zeigte und zum anderen Peptide enthielt, die wiederkehrend in den Gelsegmenten 1 und 2 identifiziert wurden. Dies deutet darauf hin, dass ausreichend Peptide per Massenspektrometrie identifizierbar sein sollten, wenn ein gutes Signal, wie z.B. von p17, im Immunoblot detektierbar ist. Dabei liegt die untere Detektionsgrenze bei einer Proteinkonzentration von 10 ng.

Die sechs „grünen“ Peptide, die mit 10 ng MalE-p25 identifiziert wurden, sind über die gesamte Aminosäuresequenz von p25 verteilt (Abbildung 19B). Hervorzuheben ist dabei, dass nur eins der Peptide (<sup>53</sup>IHALDVGDDDSVR<sup>65</sup>) mit der Region der potentiellen PopC-Spaltstelle übereinstimmt. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die PopC-Spaltstelle theoretisch mit Hilfe der Massenspektrometrie zu identifizieren ist.

Im Folgenden sollten Peptide identifiziert werden, die nach der proteolytischen Spaltung von MalE-p25 mit PopC entstehen, um die PopC-Spaltstelle zu bestimmen. Wie bereits erwähnt, ist p17 im Coomassie-gefärbten SDS-Gel nicht zu detektieren. Nach dem Vergleich der Sensitivität von Massenspektrometrie und Immunoblot wurde nun untersucht, welche Peptide aus einer Gelregion in der Laufhöhe von p17 zu identifizieren sind. Dazu wurden MalE-p25 aus zwei verschiedenen Reinigungen in ansteigender Konzentration mit Wildtyp-Zellextrakt inkubiert (5.4.10) und per SDS-PAGE aufgetrennt. In Abbildung 20A sind die Gelregionen (1-3) markiert, die per Massenspektrometrie analysiert wurden. Dazu wurden die drei Gelregionen aus der Coomassie-gefärbten SDS-PAGE ausgeschnitten, mit Trypsin verdaut und per Massenspektrometrie analysiert (5.4.12).

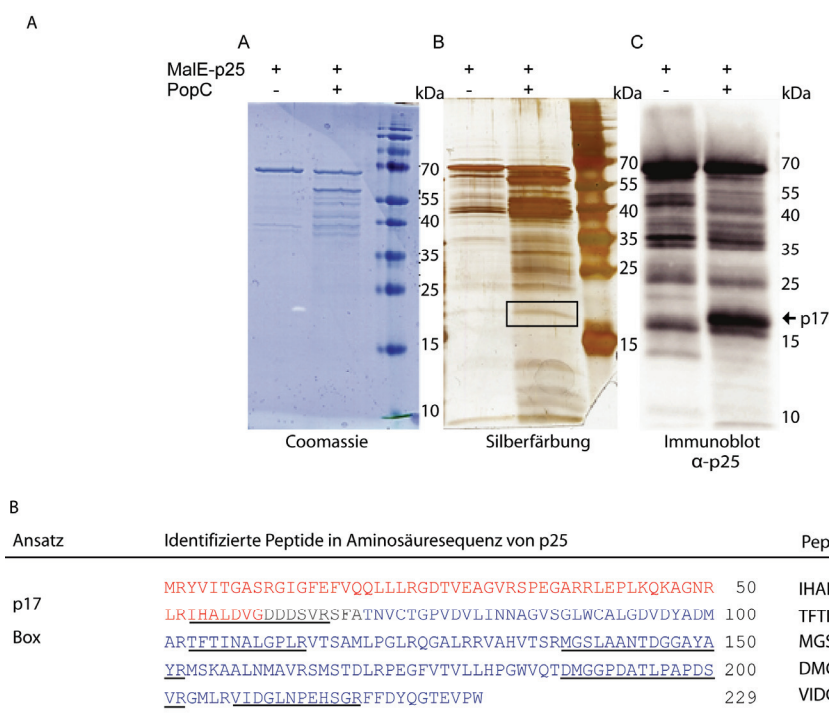


**Abbildung 20: Analyse der Gelregion im Bereich von 17 kDa. A:** SDS-Gel mit Coomassie-Färbung. Die Boxen 1-3 markieren die analysierten Gelregionen. **B:** Peptide, die durch Massenspektrometrie identifiziert wurden. Die unterstrichenen Aminosäuren in der Aminosäuresequenz von p25 zeigen die Position der identifizierten Peptide. Die in grün markierten Peptide zeigen jene Peptide an, die nicht in der Kontrolle (Box 1) gefunden wurden.

Die identifizierten Peptide aus allen drei Gelsegmenten sind über die gesamte Aminosäuresequenz von p25 verteilt (Abbildung 20B). Der Vergleich zwischen der Kontrolle ohne Wildtyp-Zellextrakt (Box 1) mit den Ansätzen mit Wildtyp-Zellextrakt (Box 2 und 3) zeigt, dass sich alle Peptide aus der Kontrolle in beiden Ansätzen wiederfinden. Zwischen den Ansätzen aus Box 2 und Box 3

stimmen alle Peptide überein. Viele der Peptide wurden nach Arginin gespalten und sind daher dem Trypsinverdau zuzuordnen. Die in grün dargestellten sieben Peptide waren in den behandelten Proben zu finden, jedoch nicht in der Kontrolle (Abbildung 20B). Die Peptide <sup>14</sup>FEFVQQLLLR<sup>23</sup> und <sup>16</sup>FVQQLLLR<sup>23</sup> sind im N-terminalen Bereich von p25 zu finden. Sollte sich die PopC-Spaltstelle hier befinden, würde dies zu einem 23 kDa Protein führen, das damit deutlich größer als p17 wäre. Eine PopC-Prozessierung an den Positionen in p25, die den Peptiden <sup>164</sup>SMSTDRLRPEGFVTVL<sup>178</sup>, <sup>179</sup>LHPGWVQTDMGGPD-AATLPAPDSVR<sup>202</sup>, <sup>188</sup>MGGPDAATLPAPDSVR<sup>202</sup> und <sup>219</sup>FFDYQGTEVPW<sup>229</sup> entsprächen, würde in einem zu kleinen Produkt resultieren (z.B. 7 kDa bei einer Spaltung vor <sup>164</sup>SMSTDRLRPEGFVTVL<sup>178</sup>). Allein das Peptid <sup>91</sup>ALGDVD-YADMAR<sup>102</sup> wäre mit einer Größe von 15 kDa vergleichbar mit p17.

Bei dem vorherigen Versuch sind die analysierten Gelregionen „blind“ aus der Coomassie-gefärbten SDS-PAGE ausgeschnitten worden. Dabei hat man sich an der Laufrhöhe von 17 kDa orientiert ohne eine konkrete Proteinbande zu sehen. Zusätzlich wurde Wildtypzelleextrakt statt gereinigtem PopC Protein verwendet. Im Folgenden wurde MalE-p25 mit gereinigtem PopC Protein inkubiert, um die entstehenden Peptide zu vergleichen. Nach der Inkubation von MalE-p25 mit PopC wurden die Ansätze per SDS-PAGE aufgetrennt und mit drei verschiedenen Färbemethoden analysiert. In Abbildung 21A ist der Vergleich zwischen diesen drei verschiedenen Färbungen gezeigt. Jeweils 1/3 derselben Probe wurde auf drei verschiedene SDS-Gele aufgetragen und mit Coomassie, Silber bzw. im Immunoblot gefärbt. In dem Coomassie-gefärbten SDS-Gel ist nur MalE-p25 zu sehen. Im Silber-gefärbten SDS-Gel ist eine Proteinbande bei ca. 17 kDa detektierbar, die in der Kontrolle ohne PopC nicht zu sehen ist. In der Immunoblot Analyse ist p17 in der Probe MalE-p25 + PopC deutlich im Gegensatz zu der Probe, die nur MalE-p25 enthält, detektierbar. Um Peptide aus p17 zu identifizieren, wurde die sichtbare Bande aus dem Silbergel ausgeschnitten, mit Trypsin verdaut und per Massenspektrometrie analysiert.



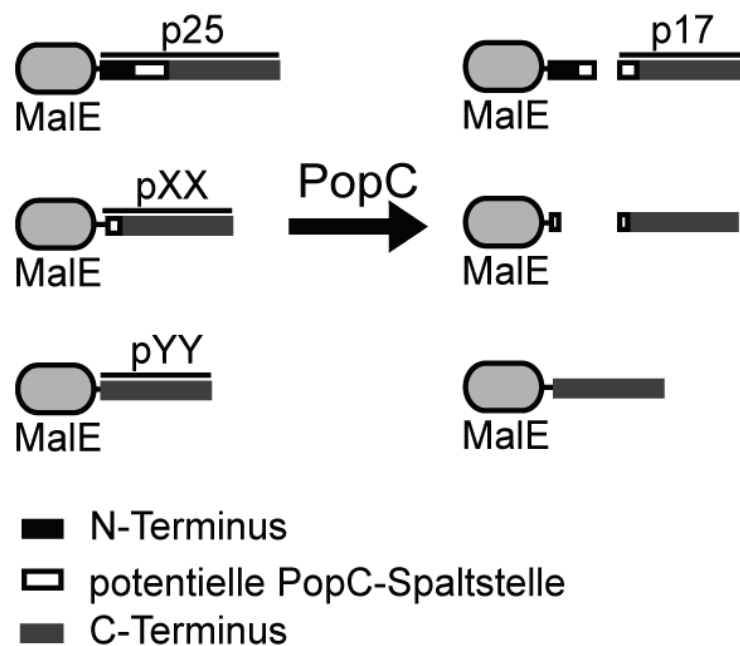
**Abbildung 21: Analyse der Gelregion im Bereich von 17 kDa. A:** Vergleich dreier Gele mit verschiedenen Färbungen. Jeweils 1/3 derselben Probe wurde über drei SDS-Gele aufgetrennt und unterschiedlich gefärbt. Die Box markiert die analysierte Gelregion. **B:** Peptide, die mittels Massenspektrometrie aus dem Silbergel identifiziert werden konnten. Die unterstrichenen Aminosäuren in der Aminosäuresequenz von p25 zeigen die Position der identifizierten Peptide.

Es konnten fünf Peptide identifiziert werden (Abbildung 21B). Diese Peptide sind, wie für p17 zu erwarten, überwiegend im C-terminalen Bereich von p25 zu finden. Alle fünf Peptide stimmen mit den Peptiden aus dem vorherigen Versuch überein (Abbildung 20B). Das zuvor detektierte Peptid <sup>91</sup>ALGDVDYADMAR<sup>102</sup> konnte nicht gefunden werden. Des Weiteren fällt auf, dass sich das Peptid <sup>53</sup>IHALDVGDDDSVR<sup>65</sup> in allen Ansätzen wiederfindet.

Zusammenfassend ergibt sich aus diesen Ergebnissen, dass es keinen entscheidenden Unterschied zwischen den behandelten Proben und den Kontrollen im Hinblick darauf gab, Peptide zu finden, mit denen man p17 identifizieren könnte. Dabei wäre bei dem letzten Versuch (Abbildung 21) eine Kontrolle wünschenswert gewesen, um die Peptide der unbehandelten Probe des Silbergels mit den Peptiden der mit PopC behandelten Probe vergleichen zu können. Hervorzuheben ist jedoch, dass das Peptid <sup>53</sup>IHALDVGDDDSVR<sup>65</sup>, das die potentielle PopC-Spaltstelle enthält, in allen Proben detektiert wurde. Damit ist es schwierig die PopC-Spaltstelle mittels Massenspektrometrie zu identifizieren.

### 5.2.3 Verkürzte MalE-p25 Deletionsderivate zur Eingrenzung der relevanten Aminosäuren für die PopC Funktionalität

Da die Massenspektrometrie keine geeignete Methode zu sein scheint, um die PopC-Spaltstelle zu bestimmen, sollte diese mit MalE-p25 Deletionsderivaten eingegrenzt werden. Die Strategie baut auf der Hypothese auf, dass bei der Anwesenheit der PopC-Spaltstelle (z.B. MalE-p25, MalE-pXX) eine Prozessierung in p17 erfolgt, während kein p17 bei der Abwesenheit der PopC-Spaltstelle in einem verkürzten MalE-Fusionsprotein (z.B. MalE-pYY) generiert werden kann (Abbildung 22).



**Abbildung 22: Strategie zur Erstellung von MalE-p25 Deletionsderivaten.** MalE-p25 wird durch PopC in p17 prozessiert. Ist die PopC-Spaltstelle vorhanden, wird das Fusionsprotein gespalten (MalE-pXX). Fehlt die PopC-Spaltstelle, spaltet PopC nicht (MalE-pYY).

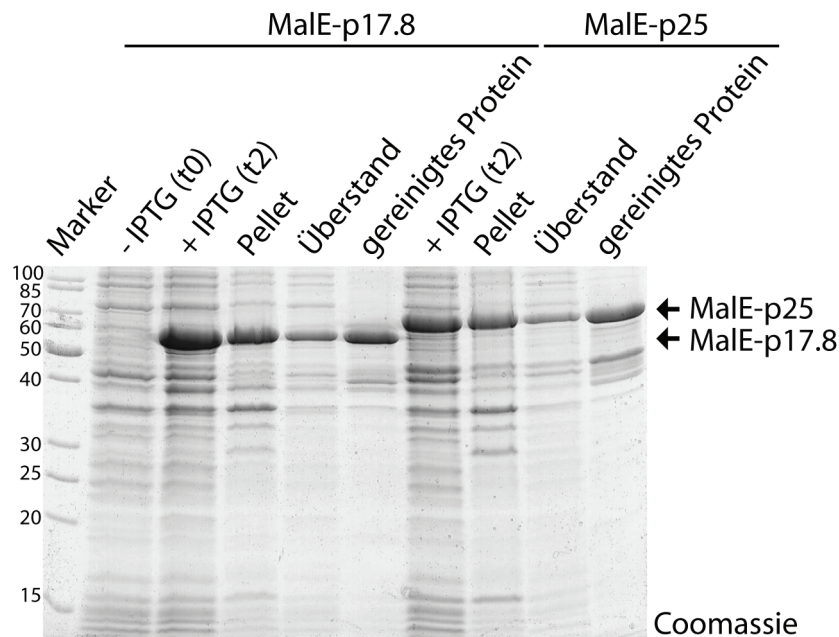
Das Fusionsprotein MalE-p17.8 mit N-terminalem Maltosebindeprotein MalE und verkürztem p25-Derivat (entspricht Aminosäuren 63-229 von p25) kann den Entwicklungsprozess einer *csgA* Mutante (DK5208) nach exogener Zugabe wiederherstellen (Lobedanz & Sogaard-Andersen, 2003). Dies deutet darauf hin, dass dieses Fusionsprotein alle Informationen enthält, die für die p17 Aktivität erforderlich sind. Um die PopC-Spaltstelle einzugrenzen, wurden MalE-p25, MalE-p17.8 und weitere verkürzte MalE-p25 Deletionsderivate mit Wildtyp-Zellextrakt bzw. gereinigtem PopC Protein inkubiert und die Spaltung der Proteine durch PopC untersucht.



### 5.2.3.1 Überexpression und Reinigung der verkürzten MalE-p25 Fusionsproteine und PopC<sup>WT</sup> / PopC<sup>S423A</sup>

Die verschiedenen MalE-p25 Deletionsderivate wurden heterolog in *E. coli* produziert, gereinigt und mit Wildtyp-Zellextrakt bzw. gereinigtem PopC<sup>WT</sup> Protein inkubiert, um die Spaltung zu p17 zu analysieren. Die Produktion und Reinigung wird beispielhaft an MalE-p17.8 und MalE-p25 erläutert. Alle anderen MalE-p25 Deletionsderivate verhielten sich vergleichbar.

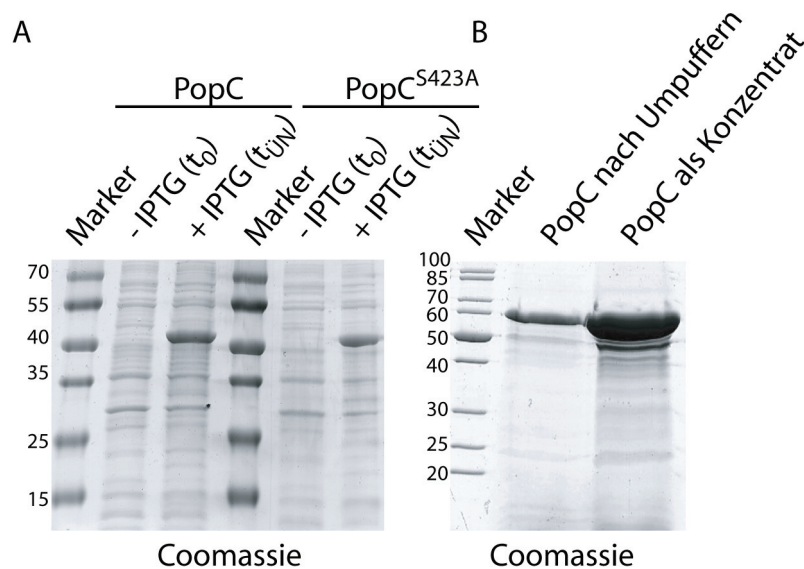
Das Plasmid pMalE-p17.8 wurde in den *E. coli* Stamm Rosetta 2 (DE3) transformiert. Der Vektor pMAL-c2x trägt einen N-terminalen MalE-tag, der für die Affinitätschromatographie benötigt wird. Nachdem die Löslichkeit des Proteins nachgewiesen worden war, erfolgte die Reinigung des Proteins per Amylose-Affinitätschromatographie aus dem Überstand (Abbildung 23).



**Abbildung 23: Produktion und Reinigung von MalE-p17.8 und MalE-p25.** Die Proben wurden über eine 14% SDS-PAGE aufgetrennt und per Coomassie gefärbt.

Um die Prozessierung von p25 durch PopC zu untersuchen, wurde gereinigtes PopC<sup>WT</sup> Protein und gereinigtes PopC<sup>S423A</sup> Protein benötigt. PopC<sup>S423A</sup> trägt die Substitution S423A in der katalytischen Triade, die zur Inaktivität des Proteins führt (Rolbetzki *et al.*, 2008). His<sub>6</sub>-PopC<sup>WT</sup> und His<sub>6</sub>-PopC<sup>S423A</sup> tragen je einen N-terminalen His-tag und sind in den *E. coli* Stamm Rosetta 2 (DE3) transformiert worden (Rolbetzki, 2007). Beide Proteine wurden aus Einschlusskörpern isoliert und zurückgefaltet, bevor sie im Experiment

eingesetzt werden konnten. Für die Produktion von His<sub>6</sub>-PopC<sup>WT</sup> und His<sub>6</sub>-PopC<sup>S423A</sup> wurde eine 500 ml Kultur in LB-Medium plus 100 µg/ml Kanamycin und 50 µg/ml Chloramphenicol bei 37°C bis zu einer OD<sub>578</sub> von 0,5 kultiviert mit 1 mM IPTG induziert und für 20 h auf 18°C inkubiert. Danach wurde die Kultur zentrifugiert und das Zellpellet bei -20°C gelagert. PopC<sup>WT</sup> und PopC<sup>S423A</sup> wurden jeweils in ihren Einschlusskörpern isoliert, solubilisiert und die Proteine zurückgefaltet. Die Abbildung 24 zeigt die Produktion und Reinigung von His<sub>6</sub>-PopC<sup>WT</sup> und His<sub>6</sub>-PopC<sup>S423A</sup>.



**Abbildung 24: Produktion und Reinigung von PopC<sup>WT</sup> und PopC<sup>S423A</sup>.** A: Die Proben wurden über eine 14% SDS-PAGE aufgetrennt und per Coomassie gefärbt. (ÜN = Über Nacht) B: PopC<sup>WT</sup> Protein nach der Isolation der Einschlusskörpern und Rückfaltung. Abgebildet ist eine mit Coomassie gefärbte 16% SDS-PAGE.

### 5.2.3.2 PopC-abhängige Spaltung der verkürzten MalE-p25 Deletionsderivate

Neun MalE-p25 Deletionsderivate wurden hinsichtlich ihres Spaltverhaltens durch PopC<sup>WT</sup> untersucht (Abbildung 25). Dazu wurden die Proteine MalE-p17.8 bis MalE-p16.5 mit Wildtyp- bzw. *popC* Zellextrakt inkubiert. In Abbildung 26 ist diese PopC-abhängige Spaltung beispielhaft an MalE-p25 gezeigt. Eine PopC-abhängige Spaltung von MalE-p25 ist auch zu beobachten, wenn gereinigtes PopC<sup>WT</sup> statt des Wildtyp Zellextrakts verwendet wird. Das inaktive PopC<sup>S423A</sup> ist nicht in der Lage MalE-p25 zu spalten. Um auszuschließen, dass das MalE-p25 Protein von vornherein eine Bande in der



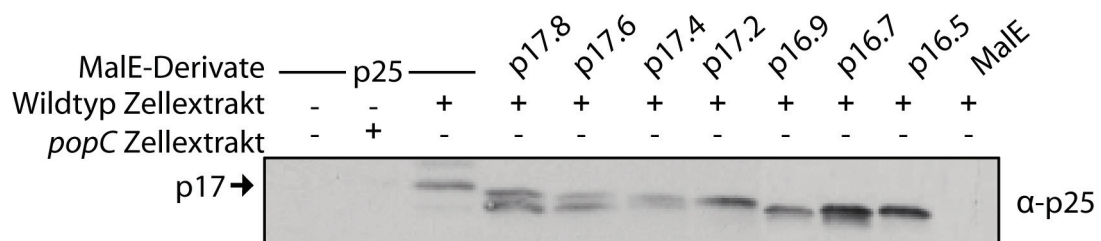
Höhe von 17 kDa zeigt, wurde unbehandeltes MalE-p25 als Kontrolle aufgetragen.

### p25

MRYVITGASRGIGFEFVQQLLRGDTVEAGVRSPEGARRLEPLKQKAGNR 50  
 LRIHALDVGDDDSVRSFATNVCTGPVDVLINNAGVSGLWCALGDVDYADM 100  
 ARTFTINALGPLRVTSAMLPGRLRQALRRVAHVTSRMGSLAANTDGGAYA 150  
 YRMSKAALNMAVRSMSTDRLRPEGEFVTVLLHPGWVQTDMGGPDATLPAPDS 200  
 VRGMLRVIDGLNPEHSGRFFDYQGTEVPW 229

a) p18.6; b) p18.4; c) p17.8; d) p17.6; e) p17.4; f) p17.2; g) p16.9; h) p16.7; i) p16.5

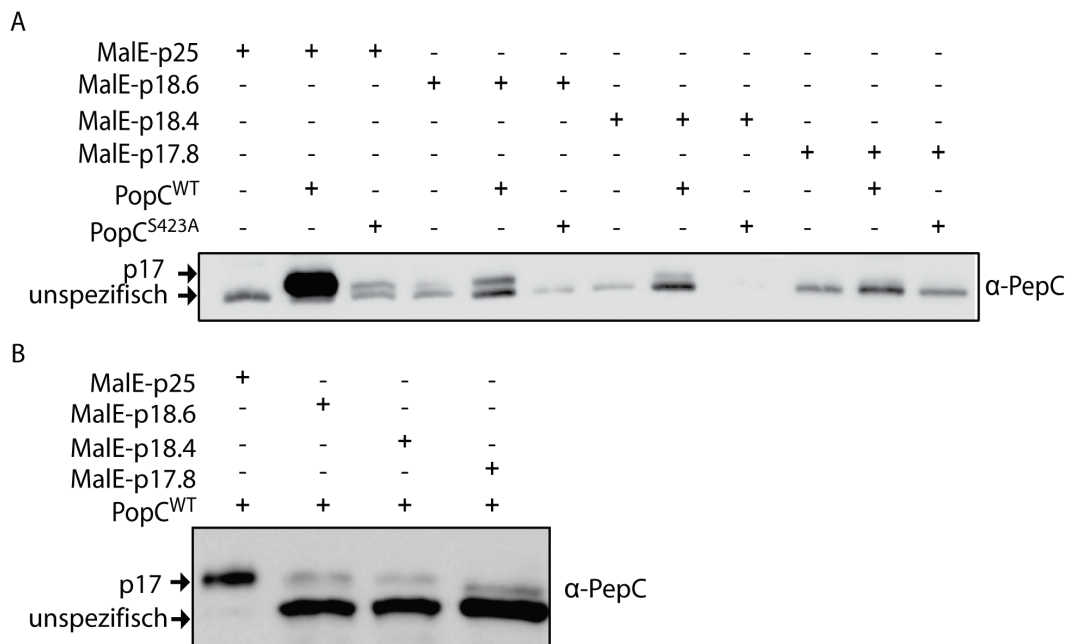
**Abbildung 25: MalE-p25-Deletionsmutanten.** Verkürzte Versionen von MalE-p25 sind mit a) bis i) gekennzeichnet. Der Pfeil markiert die jeweilige erste Aminosäure im Protein.



**Abbildung 26: Alle MalE-p25 Deletionsderivate werden PopC-abhängig geschnitten.** MalE-p25 Deletionsderivate wurden mit Wildtyp Zellextrakt für 2 Stunden auf Eis inkubiert. Die Proteine wurden über die 16% SDS-PAGE aufgetrennt und p17 per Immunoblot Analyse detektiert. Die verwendeten Antikörper sind gegen p25 gerichtet.

Bei der Immunoblot Analyse der sieben MalE-p25 Deletionsderivate ausgehend von MalE-p17.8 konnten zwei wichtige Beobachtungen gemacht werden. Erstens wurden alle Fusionsproteine in einer PopC-abhängigen Art und Weise gespalten (Daten nicht gezeigt). Zweitens unterscheiden sich diese Spaltprodukt in ihrer molekularen Masse unter Berücksichtigung der Auflösung einer SDS-PAGE. In Abbildung 26 wird deutlich, dass von MalE-p25 ausgehend MalE-p17.8 bis MalE-p16.5 Spaltprodukte zeigen, die stets kleiner werden. Vergleicht man p17, das von MalE-p25 abgespalten wird, mit dem Spaltprodukt von Mal-p17.8, ist ein deutlicher Unterschied im Laufverhalten zu erkennen. Dieser Unterschied nimmt zu, je kürzer das MalE-p25 Deletionsderivat wird. Diese Daten lassen vermuten, dass PopC die kürzeren Fusionsproteine im Bereich zwischen dem MalE-tag und dem fusionierten p25-Derivat spalten könnte. Demzufolge wurden zusätzlich MalE-p18.6 und MalE-p18.4 mit in die

Untersuchung einbezogen, um zu prüfen, ob die Spaltung dieser Proteine zu einem Spaltprodukt vergleichbar mit p17 aus MalE-p25 führt (Abbildung 27).



**Abbildung 27: Das Spaltprodukt aus MalE-p18.6 und MalE-p18.4 verhält sich wie p17 aus MalE-p25.** **A** MalE-p25 Deletionsderivate wurden mit PopC<sup>WT</sup> bzw. PopC<sup>S423A</sup> für 24 Stunden bei 32°C inkubiert. Die Proteine wurden über die 16% SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Immunoblot analysiert. **B** Da MalE-p25 in einer höheren Effizienz als die anderen MalE-Fusionsproteine gespalten wurde, wurde in diesem SDS-Gel eine geringe Konzentration an MalE-p25 aufgetragen, um die Banden bezüglich ihres Laufverhaltens besser vergleichen zu können.

In den Immunoblot Analysen in Abbildung 27 wurde das unbehandelte MalE-Fusionsprotein (MalE-p25, MalE-p18.6 usw.) jeweils neben der mit PopC<sup>WT</sup> inkubierten Probe aufgetragen. Um zu bestätigen, dass die Prozessierung PopC-spezifisch ist, wurde das Fusionsprotein außerdem mit PopC<sup>S423A</sup> inkubiert. MalE-p18.6 und MalE-p18.4 wurden genauso gespalten wie MalE-p25. Daher weist das Spaltprodukt von MalE-p18.6 und MalE-p18.4 die gleiche Größe wie p17 von MalE-p25 auf. Im Gegensatz dazu zeigt das Spaltprodukt von MalE-p17.8 eine kleinere Masse. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass MalE-p17.8 die PopC-Spaltstelle fehlt und diese dementsprechend vor Serin 63 in p25 lokalisiert sein sollte (Abbildung 28). Da MalE-p18.6 und MalE-p18.4 jeweils ein Spaltprodukt in der Größe von p17 ergaben, ist anzunehmen, dass diese beiden Fusionsproteine die PopC-Spaltstelle enthalten. Daher deuten die Daten darauf hin, dass PopC p25 *downstream* von Alanin 55 und *upstream* von Serin 63 spaltet.

Aminosäuresequenz p25 M[...]GNRLRIHA<sup>55</sup>LDVG<sup>63</sup>DDDSVRAFAFATNV[...]W

a) p18.6; b) p18.4; c) p17.8; d) p17.6; e) p17.4; f) p17.2

**Abbildung 28: Die PopC-Spaltstelle liegt vermutlich zwischen den Aminosäuren Alanin 55 und Serin 63 in p25. A:** Aminosäuresequenz von p25 mit untersuchten MalE-p25 Deletionsderivaten **B:** PopC-Spaltstelle liegt vermutlich zwischen den Aminosäuren Alanin 55 und Serin 63, die mit der offenen Box markiert sind. Verkürzte Versionen von MalE-p25 sind mit a) bis f) gekennzeichnet. Der Pfeil markiert die jeweilige erste Aminosäure im Protein.

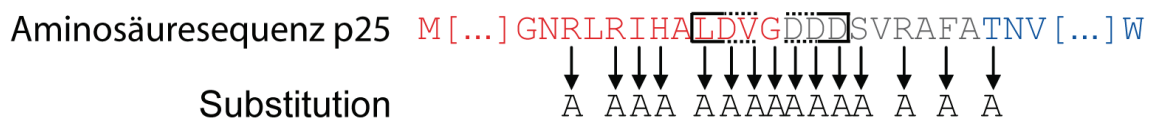
Wie bereits erwähnt, deuten die Ergebnisse darauf hin, dass PopC in den verkürzten MalE-p25 Deletionsderivaten am Übergang zwischen dem MalE-tag und dem fusionierten p25-Derivat spaltet. An diesem Übergang befindet sich eine Faktor Xa-Spaltstelle, die genutzt werden kann, um das Zielprotein vom Affinitätstag abzuspalten (Abbildung 29). Die Abspaltung des MalE-tags würde bei MalE-p17.6 entsprechend zu einem 17.6 kDa Protein etc. führen.

	MalE-tag
MalE-p25	NNNLGIEGR-MRYVIT
MalE-p18.6	NNNLGIEGR-LDVG <sup>D</sup>
MalE-p18.4	NNNLGIEGR-VG <sup>D</sup> DD <sup>D</sup>
MalE-p17.8	NNNLGIEGR-SVRSFA
MalE-p17.6	NNNLGIEGR-RSFATN
MalE-p17.4	NNNLGIEGR-FATNVC
MalE-p17.2	NNNLGIEGR-TNVCTG
MalE-p16.9	NNNLGIEGR-VCTGPV
MalE-p16.7	NNNLGIEGR-TGPVDV
MalE-p16.5	NNNLGIEGR-VDVLIN
	Faktor Xa Spaltstelle

**Abbildung 29: Faktor Xa Spaltstelle in MalE-p25 Deletionsderivaten.** In den MalE-p25 Deletionsderivaten folgt direkt auf die Faktor Xa Spaltstelle die Aminosäuresequenz des entsprechenden p25-Derivats. Die schwarze Sequenz markiert den C-Terminus des MalE-tags, die Farbgebung der p25-Derivate ist: rot: N-terminus von p25, grau: potentielle PopC-Spaltstelle, blau: C-Terminus von p25

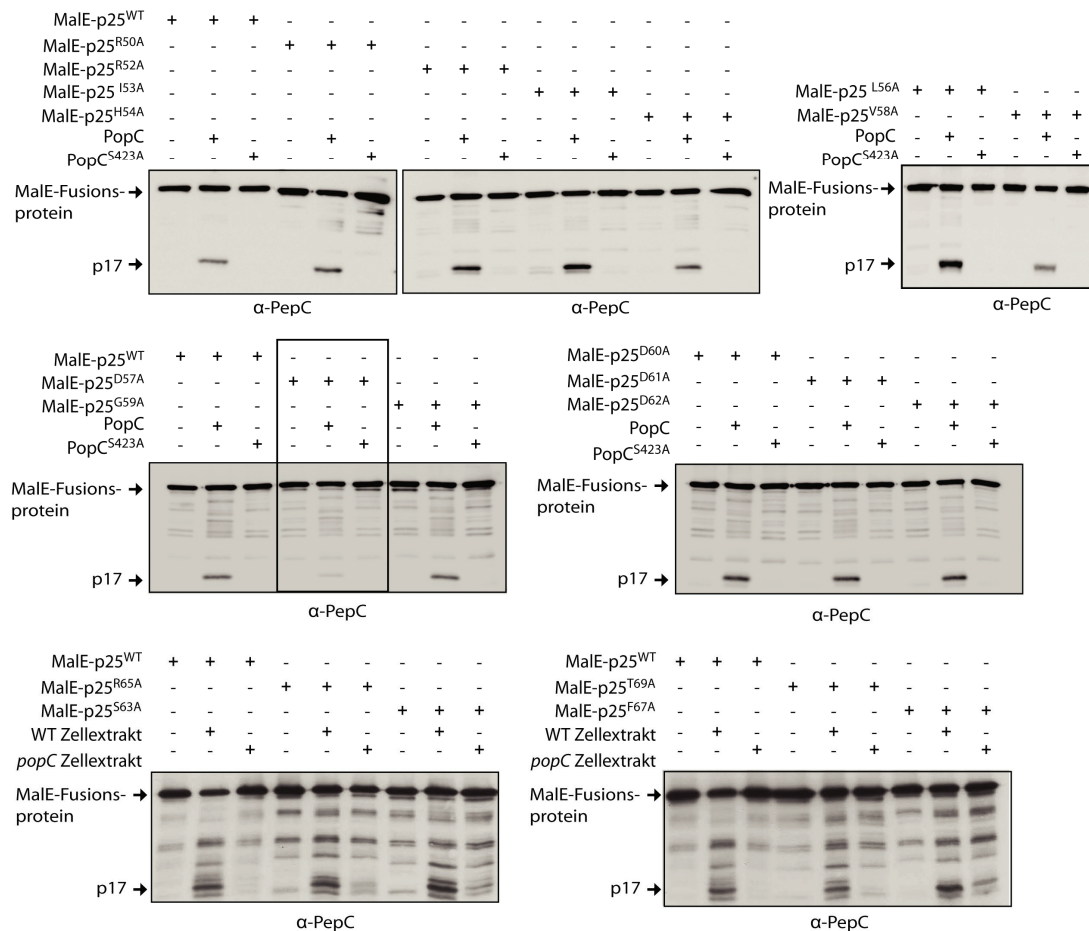
#### 5.2.4 Alaninsubstitutionen *in vitro*

Um Aminosäuren zu identifizieren, die relevant für die PopC-spezifische Spaltung von p25 sind, wurden 15 Alaninsubstitutionen von Aminosäuren um die potentielle PopC-Spaltstelle hergestellt und analysiert (5.3.10). Diese Substitutionen wurden heterolog in *E. coli* Rosetta 2 (DE3) produziert, gereinigt und auf eine PopC-spezifische Spaltung mit gereinigtem PopC<sup>WT</sup> überprüft. Dabei wurde die inaktive PopC<sup>S423A</sup>-Mutante zur Kontrolle herangezogen, bei der keine Spaltung in p17 erfolgen soll. Es wurde erwartet, dass ein MalE-p25 Protein, das eine Mutation in der PopC-Spaltstelle trägt, nicht mehr in p17 prozessiert werden kann. Abbildung 30 zeigt die Alaninsubstitutionen, die jeweils vorgenommen und untersucht wurden.



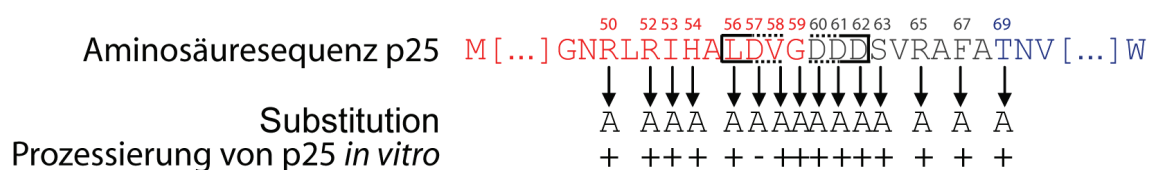
**Abbildung 30: Alaninsubstitutionen im Bereich der potentiellen PopC-Spaltstelle *in vitro*.** 15 Aminosäuren wurden jeweils einzeln durch *site-directed mutagenesis* in Alanin substituiert. Die Box hebt die vermutete Position der PopC-Spaltstelle hervor, die sich aus den Ergebnissen von 6.2.3. ergibt.

In den Immunoblot Analysen konnte nur in der Mutante MalE-p25<sup>D57A</sup> eine stark reduzierte Spalteffizienz von PopC detektiert werden, während alle anderen 14 Alaninsubstitutionen eine Prozessierung in p17 zeigten (Abbildung 31). Diese Prozessierung war PopC spezifisch, da die Kontrollen, die mit PopC<sup>S423A</sup> inkubiert wurden, kein p17 zeigten. Es wurden außerdem Substitutionen mit Wildtyp Zellextrakt bzw. mit *popC* Zellextrakt behandelt. Auch hier war p17 nur in den mit Wildtyp-Zellextrakt behandelten Proben zu detektieren. Um auszuschließen dass das Protein selbst eine Proteinbande in der Höhe von 17 kDa zeigt, wurde jeweils eine unbehandelte Proteinprobe aufgetragen.



**Abbildung 31: MalE-p25<sup>D57A</sup> zeigt eine drastische Reduzierung der PopC Spalteffizienz.** Mutagenisierte MalE-p25 Proteine und Wildtyp MalE-p25 wurden mit Wildtyp Zellextrakt und *popC* Zellextrakt für 2 h auf Eis bzw. mit PopC<sup>WT</sup> Protein und PopC<sup>S423A</sup> Protein für 24 h bei 32°C inkubiert. Die Proteine wurden per 16% SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Immunoblot analysiert. Die Box hebt die Mutante MalE-p25<sup>D57A</sup> hervor, bei der PopC eine reduzierte Spalteffizienz zeigt.

Während alle anderen Alaninsubstitutionen durch PopC in p17 prozessieren werden konnten, hatte PopC bei der Mutante MalE-p25<sup>D57A</sup> eine stark reduzierte Spalteffizienz. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Aminosäure Aspartat 57 essentiell für die Spaltung von PopC ist und daher im Bereich der PopC-Spaltstelle positioniert sein muss. Dieses Ergebnis stimmt mit dem Fazit aus 6.2.3 überein (Abbildung 32).

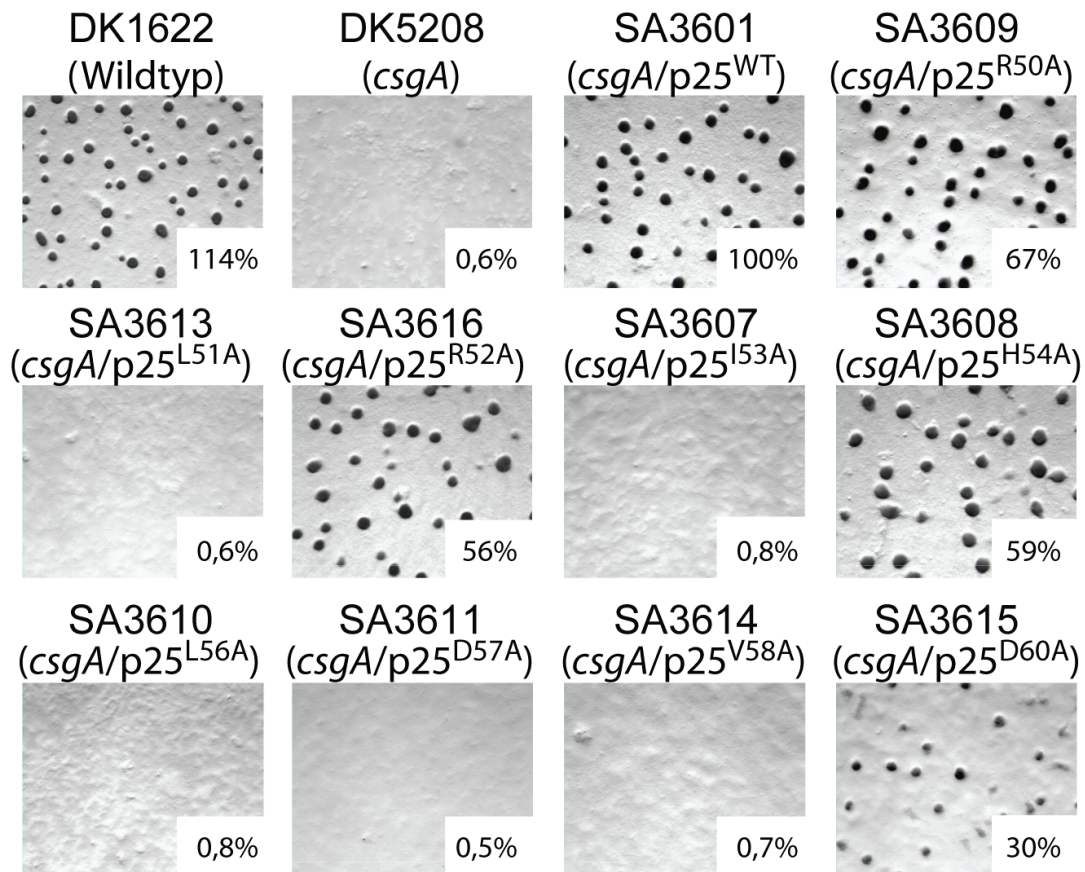


**Abbildung 32: MalE-p25<sup>D57A</sup> wird von PopC nicht in p17 prozessiert.** Von den untersuchten 15 Alaninsubstitutionen zeigt nur die Mutante MalE-p25<sup>D57A</sup> einen Defekt in der PopC Prozessierung in p17. + normale Prozessierung von p25, - stark reduzierte Prozessierung von p25

### 5.2.5 Alaninsubstitutionen *in vivo*

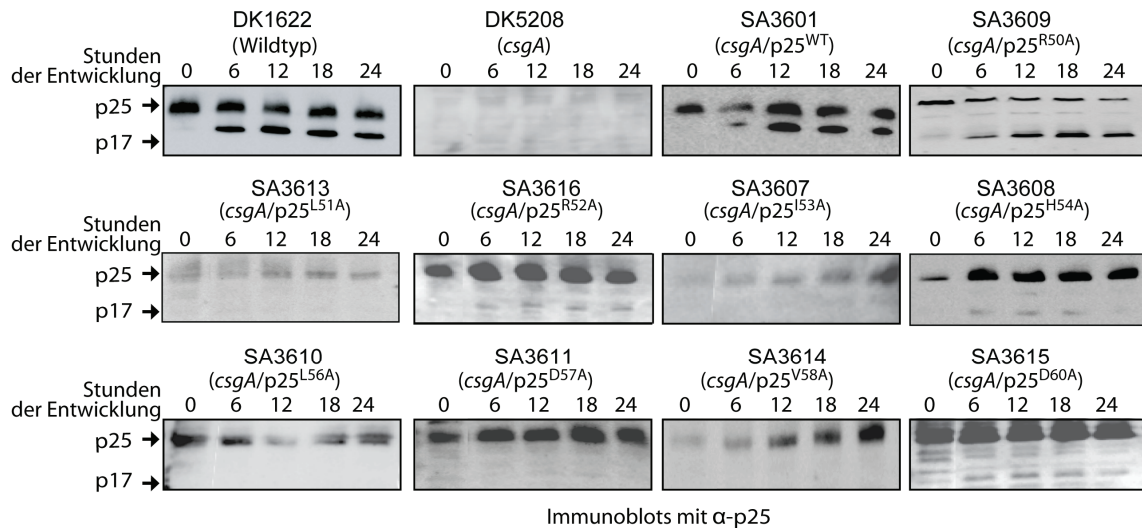
Aus den bisherigen Ergebnissen lässt sich vermuten, dass sich die PopC-Spaltstelle zwischen den Aminosäuren Alanin 55 und Serin 63 befindet. Bei der Untersuchung der Alaninsubstitutionen *in vitro* zeigte eine Mutante (MalEp25<sup>D57A</sup>) eine reduzierte PopC-Spalteffizienz. Um der Frage nachzugehen, ob die Aminosäuren *upstream* von Serin 63 relevant für die PopC-Spaltung *in vivo* sind, wurden 10 der 15 Alaninsubstitutionen *in vivo* analysiert. Für diese Untersuchung wurde das Plasmid pMA15neu mutagenisiert (5.3.10). Dieses Plasmid enthält die Region 1kb *upstream* des Genes *csgA* als Promotorregion und das *csgA* Gen. pMA15neu wurde, nach der Mutagenese, durch Sequenz-spezifische Rekombination an der *phage Mx8-attB site* auf dem *M. xanthus* Chromosomen der *csgA* Mutante (DK5208) integriert. Die *csgA* Mutante ist aufgrund einer Tn5-Insertion im *csgA* Gen unfähig p25 und damit p17 zu produzieren. Zur Komplementation der *csgA* Mutation im Stamm DK5208 wurde das nicht mutierte pMA15neu integriert. Es entsteht der Komplementationsstamm SA3601. Alle Klone wurden auf Kanamycin und Oxytetracyclin selektiert, wobei die Gene für die Kanamycin-Resistenz auf dem Plasmid liegen und der Empfängerstamm die Oxytetracyclin-Resistenz trägt. Die relevanten Klone wurden hinsichtlich der Integration des Plasmids per PCR überprüft. Bis auf eine Alaninsubstitution p25<sup>G59A</sup> war die Transformation in allen anderen Fällen (p25<sup>R50A</sup>, p25<sup>L51A</sup>, p25<sup>R52A</sup>, p25<sup>I53A</sup>, p25<sup>H54A</sup>, p25<sup>L56A</sup>, p25<sup>D57A</sup>, p25<sup>V58A</sup> und p25<sup>D60A</sup>) erfolgreich. Die Entwicklungsphänotypen der Mutanten wurden auf TPM-Agar untersucht, die Sporulation durch die Bestimmung der Gesamtsporenzahl überprüft und die Proteinkonzentrationen von p25 und p17 in Immunoblot Analysen kontrolliert.





**Abbildung 33: Phänotypen der Alaninsubstitutionsmutanten *in vivo*.** Neun Alaninsubstitutionsmutanten wurden auf TPM-Agar hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Entwicklung untersucht. Die Bilder zeigen die verschiedenen Mutantenstämme mit den Kontrollen DK1622 (Wildtyp), DK5208 (*csgA::Tn5-132*  $\Omega$ LS205) und SA3601 (Komplementationsstamm) nach 120 Stunden. Die Sporenzahl (in %) wurde nach 120 Stunden auf TPM-Agar durch die Zählung der Gesamtsporenzahl in der Thoma Zählkammer ermittelt.

Abbildung 33 zeigt die Bilder der Entwicklungsphänotypen nach 120 h auf TPM-Agar. Als Kontrollen wurden der Wildtyp DK1622, die *csgA* Mutante DK5208 und der Komplementationsstamm SA3601 verwendet. Die Kontrollen zeigen deutlich den jeweils erwarteten Phänotyp. Während der Wildtyp DK1622 Fruchtkörper ausgebildet hat, sind bei der *csgA* Mutante DK5208 keine Aggregation oder Fruchtkörperbildung zu erkennen. Der Komplementationsstamm SA3601 verhält sich wie der Wildtyp DK1622. Die Mutanten SA3609 (*p25<sup>R50A</sup>*), SA3616 (*p25<sup>R52A</sup>*), SA3608 (*p25<sup>H54A</sup>*) und SA3615 (*p25<sup>D50A</sup>*) entsprechen dem Wildtyp Entwicklungsphänotyp. Die Mutanten SA3613 (*p25<sup>L51A</sup>*), SA3607 (*p25<sup>I53A</sup>*), SA3610 (*p25<sup>L56A</sup>*), SA3611 (*p25<sup>D57A</sup>*) und SA3614 (*p25<sup>V58A</sup>*) zeigen einen starken Entwicklungsdefekt. Diese Mutanten sind nicht in der Lage zu aggregieren, Fruchtkörper zu bilden oder zu sporulieren.



**Abbildung 34: Immunoblot Analyse der Alaninsubstitutionen *in vivo*.** *M. xanthus* Zellen hungerten über 24 h in MC7 Medium. Für die Immunoblots wurden die Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und die Proben mit vergleichbarer Zellzahl per 16% SDS-PAGE aufgetrennt.

Abbildung 34 zeigt Immunoblot Analysen von Proteinproben der Kontrollen und Mutanten während der Entwicklung nach 0, 6, 12, 18 und 24 h, die mit spezifischen Antikörpern gegen p25 behandelt wurden. Die Kontrollen DK1622, DK5208 und SA3601 entsprechen den erwarteten Proteinkonzentrationen von p25 und p17. Im Wildtyp DK1622 ist p25 zu allen Zeitpunkten detektierbar, während p17 nach sechs Stunden Hungerzustand auftritt. In der *csgA* Mutante DK5208 sind weder p25 noch p17 sichtbar. In SA3601 verhalten sich p25 und p17 wie im Wildtyp. Die Mutanten SA3609 (p25<sup>R50A</sup>), SA3616 (p25<sup>R52A</sup>), SA3608 (p25<sup>H54A</sup>) und SA3615 (p25<sup>D50A</sup>) zeigen normale p25-Konzentrationen. Bis auf SA3609 sind diese Mutanten jedoch ein wenig in der p17-Konzentration reduziert. SA3613 (p25<sup>L51A</sup>) und SA3607 (p25<sup>I53A</sup>) weisen stark reduzierte p25-Konzentrationen auf und folglich ist auch kein p17 detektierbar. In den Mutanten SA3610 (p25<sup>L56A</sup>), SA3611 (p25<sup>D57A</sup>) und SA3614 (p25<sup>V58A</sup>) ist die Konzentration an p25 normal im Vergleich zum Wildtyp, jedoch kein p17 detektierbar. Dies ist ein starker Hinweis darauf, dass in diesen Mutanten PopC nicht mehr in der Lage ist p25 in p17 zu spalten und daher kein Entwicklungszyklus eingeleitet werden kann.

In Abbildung 35 sind die Ergebnisse der Untersuchung der Alaninsubstitutionsmutanten *in vitro* und *in vivo* zusammengefasst. Beginnend mit der Analyse der verkürzten MalE-p25 Deletionsderivaten konnte die Region



der PopC-Spaltstelle bereits eingegrenzt werden. Das Spaltprodukt aus MalE-p18.6 und MalE-p18.4 hatte dieselbe molekulare Masse im SDS-Gel wie p17 aus MalE-p25, war jedoch größer als das Spaltprodukt von MalE-p17.8. Daher lässt sich schlussfolgern, dass die PopC-Spaltstelle in dem Bereich von p25 lokalisiert ist, welcher den Unterschied zwischen MalE-p17.8 und MalE-p18.6 darstellt. Die PopC-Spaltstelle wurde dementsprechend auf den Bereich zwischen Alanin 55 und Serin 63 begrenzt. Von den 15 Alaninsubstitutionen wies nur eine Mutante (MalE-p25<sup>D57A</sup>) *in vitro* einen Defekt in der p25-Prozessierung durch PopC auf. Keine andere Alaninsubstitution zeigte *in vitro* einen Einfluss auf das Spaltverhalten von PopC. *In vivo* zeigten fünf der neun Mutanten Defekte in der Fruchtkörperbildung und Sporulation, wobei in zwei dieser Mutanten (SA3613 (p25<sup>L51A</sup>), SA3607 (p25<sup>I53A</sup>)) eine reduzierte Konzentration von p25 nachweisbar war. Damit sind die Mutanten SA3610 (p25<sup>L56A</sup>), SA3611 (p25<sup>D57A</sup>) und SA3614 (p25<sup>V58A</sup>) jene, die ausreichende Mengen p25 bilden, jedoch in der Spaltung von p25 zu p17 inhibiert sind.

Aminosäuresequenz p25	M [ ... ]	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	65	67	69								
		G	N	R	L	R	I	H	A	L	D	V	G	D	D	S	V	R	A	F	A	T	N	V	[ ... ]	W
		↓	↓	↓	↓			↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓		↓		↓							
Substitution		AA	AA	A	A			AAAA	AAAA	AAAA						A	A	A								
Prozessierung von p25 <i>in vitro</i>		+	+	+	+			+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+								
p25 <i>in vivo</i>		+	↓	+	↓	+		+	+	+		+														
p17 <i>in vivo</i>		+	(-)	↓	(-)	↓		-	-	-		↓														
Aggregation		+	-	+	-	+		-	-	-		+														
Sporulation		+	-	↓	-	↓		-	-	-		↓														

**Abbildung 35: p25<sup>D57A</sup> zeigt *in vitro* als auch *in vivo* eine Relevanz im PopC-Spaltverhalten.** Nur eine der 15 Alaninsubstitutionen (MalE-p25<sup>D57</sup>) zeigt einen Effekt bei der Prozessierung von p25 *in vitro*. *In vivo* sind fünf Mutationen in Ihrer Fähigkeit normal in den Entwicklungszyklus einzutreten gehemmt. Dabei ist p25<sup>D57A</sup> in beiden Fällen von zentraler Bedeutung. + normale Prozessierung von p25; - - stark reduzierte Prozessierung von p25; (-) Detektion von p17 nicht zu erwarten, da p25 Konzentration reduziert; ↓ reduzierte Konzentrationen an Protein bzw. an Sporen.

## 6 Diskussion

### 6.1 p25 Lokalisation auf der Zelloberfläche von *M. xanthus*

Bisherige Daten lassen darauf schließen, dass p17 auf der Zelloberfläche exponiert ist. p25 wurde, wie p17, in der äußeren Membran nachgewiesen (Lobedanz & Sogaard-Andersen, 2003). Für die exakte Orientierung von p25 sind zwei verschiedene Modelle denkbar. p25 könnte auf der Zelloberfläche exponiert oder in den periplasmatischen Raum gerichtet sein. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass sich p25 auf der Zelloberfläche befindet. In *Cell shaving* Experimenten wurde p25 mit einer unspezifischen Protease Proteinase K (PK) auf intakten Zellen im selben Maße degradiert wie PilQ. PilQ ist ein Protein der äußeren Membran, das auf der Zelloberfläche exponiert ist (Nudleman *et al.*, 2006; Wall *et al.*, 1999). Weitere Kontrollproteine sind Tgl, ein Lipoprotein der äußeren Membran, das ins Periplasma gerichtet ist (Rodriguez-Soto & Kaiser, 1997), und PilC, ein Protein der inneren Membran (Bulyha *et al.*, 2009). Im Gegensatz zu p25 und PilQ verhielten sich Tgl und PilC gegenüber der Behandlung durch PK relativ stabil. Es kann damit ausgeschlossen werden, dass PK in den periplasmatischen Raum gelangt. Die Quantifizierung der Signalstärken von Tgl und PilC deuten auf eine minimale Zelllyse hin. Diese Zelllyse könnte auf die verschiedenen Zentrifugations- und Waschschrte während des Experiments zurückzuführen sein. Demzufolge ist der Proteinabbau von p25 und PilQ nicht auf eine Zelllyse als Folge der PK Behandlung zurückzuführen. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass p25 auf der Zelloberfläche exponiert ist.

Mit der Lokalisation von p25 auf der Zelloberfläche sind Aussagen über das bislang unbekannte Sekretionssystem von PopC zu machen. *M. xanthus* verfügt über alle Translokationssysteme, die am Transport ungefalteter Proteine und am Einbau der Proteine in die innere Membran beteiligt sind (Konovalova *et al.*, 2010). Den Transport von gefalteten Proteinen über die innere Membran gewährleistet das Twin-Arginine-Translokations(Tat)-System (Kimura *et al.*, 2006), während ungefaltete Proteine über den Sec-Transportweg ins Periplasma transportiert werden (Gerlach & Hensel, 2007). Da PopC, sowie p25, kein Signalpeptid enthält, sollte der Transport von PopC direkt vom

Zytoplasma auf die Zelloberfläche erfolgen. Dafür sind die Sekretionssysteme I, III, IV und VI relevant (Economou *et al.*, 2006), wobei das Typ IV System nicht in *M. xanthus* vorhanden ist (Konovalova *et al.*, 2010). Die bisherigen Untersuchungen zum Sekretionsmechanismus von PopC haben ergeben, dass von den untersuchten Sekretionssystemen I, III und VI nur das Typ-VI Sekretionssystem einen Defekt in der Fruchtkörperbildung zeigt, wobei die PopC-Sekretion und die p17 Akkumulation nicht beeinflusst sind (Konovalova, unveröffentlicht).

Zusätzlich wurde das *Cell Shaving* Experiment an hungernden Zellen durchgeführt. Dabei konnte eine erhöhte Fragilität der hungernden *M. xanthus* Zellen beobachtet werden, die es nicht möglich machte, optimale Bedingungen für die PK Behandlung zu finden. Im Verlauf des Entwicklungszyklus erfolgt eine generelle Zelllyse von ca. 60% der anfänglichen Gesamtpopulation aus vermutlich altruistischen Gründen (Konovalova *et al.*, 2010; O'Connor & Zusman, 1991; Wireman & Dworkin, 1977). Dies scheint eine Voraussetzung für die erfolgreiche Fruchtkörper- und Myxosporenbildung zu sein, da Mutanten, die keine Autolyse durchführen können, unstrukturierte Fruchtkörper ausbilden und weniger Sporen produzieren (Nariya & Inouye, 2008). Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass die Fragilität der hungernden Zellen beim *Cell Shaving* Experiment auf eine Autolyse zurückzuführen ist. Die verwendeten Zellen waren für 7 Stunden dem Hunger ausgesetzt, so dass p17 im Immunoblot detektierbar ist. Da die C-Signalweiterleitung zu diesem Zeitpunkt gerade erst begonnen hat, nehmen die Zellen noch keine morphologischen Änderungen vor, wie es beispielsweise nach 24 Stunden bei der Fruchtkörperbildung zu beobachten ist. Damit ist eine entwicklungsbedingte Autolyse auszuschließen. Ein weiterer Faktor, der bei der Fragilität der Zellen eine Rolle spielen könnte, ist der Minimalpuffer MC7. Die Zellen werden in MC7-Puffer aus 10 mM MOPS und 1 mM  $\text{CaCl}_2$  aufgenommen, um den Entwicklungszyklus durch Hunger auszulösen (Kuner & Kaiser, 1982). Während des Entwicklungszyklus sind die Zellen einem Stresszustand ausgesetzt, der dazu führen könnte, dass die Zellen fragiler werden oder schneller lysieren. Es wurde bisher nicht beobachtet, dass dies auf die Verwendung dieses Puffers zurückzuführen ist. Um den Einfluss des Puffers und der allgemeinen Versuchsbedingungen zu

berücksichtigen, wurde stets eine unbehandelte Kontrolle der entsprechenden Zellen mitgeführt. Diese zeigte keine Auffälligkeiten. Letztendlich kann daher über die Ursache der Zellyse bei hungernden Zellen während der *Cell Shaving* Experimente nur spekuliert werden.

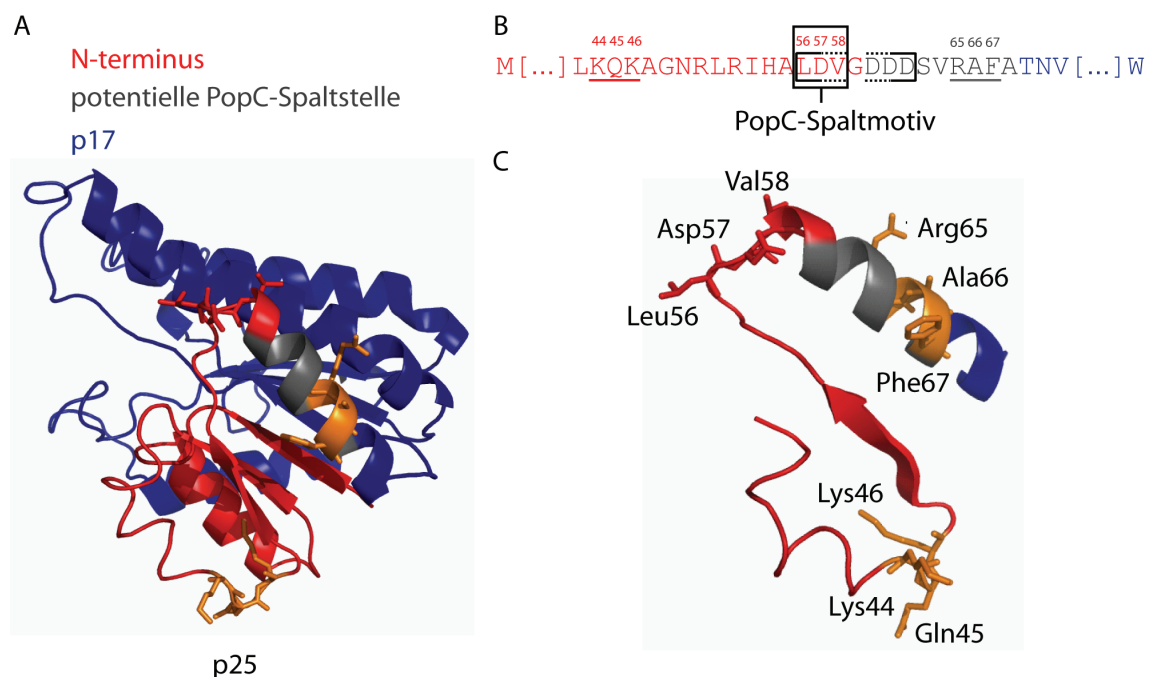
## 6.2 Spaltstelle von PopC in p25

Die Subtilisin-ähnliche Serinprotease PopC spaltet das C-Signalläufigerprotein p25, um das C-Signal p17 zu generieren (Rolbetzki *et al.*, 2008). Die genaue Spaltstelle war bisher nicht bekannt. Von der abgeschätzten molekularen Masse von p17 im SDS-Gel wurde die Spaltstelle zwischen den Aminosäuren 60-68 in p25 vermutet und als potentielle PopC-Spaltstelle bezeichnet (Lobedanz & Sogaard-Andersen, 2003).

Synthetische Peptide werden in vielen Studien herangezogen, um Spaltnotive zu identifizieren und die Effizienz eines Spaltvorganges zu ermitteln (Ijaz *et al.*, 1995; Toure *et al.*, 2000) oder Strukturen aufzuklären (Spyranti *et al.*, 2010). Dabei werden Peptide verwendet, die dem Substrat entsprechen, um so die Spaltprodukte zu analysieren und wichtige Aminosäuren für die Spaltung zu identifizieren (Toure *et al.*, 2000). Demzufolge sollten für die Bestimmung der PopC-Spaltstelle synthetische Peptide verwendet werden, die jeweils mit gereinigtem PopC<sup>WT</sup> bzw. gereinigtem inaktivem PopC<sup>S423A</sup> inkubiert wurden. Die entstehenden Spaltprodukte wurden per Massenspektrometrie analysiert. Die beiden verwendeten synthetischen Peptide stimmen mit der Aminosäuresequenz von p25 überein, die als potentielle PopC-Spaltstelle gilt. Das zweite Peptid wurde synthetisiert, um zu gewährleisten, dass mögliche Erkennungssequenzen vorhanden sind, die im ersten Peptid fehlen könnten. Die zwei synthetischen Peptide wurden je ein Mal von PopC gespalten, jedoch an zwei unterschiedliche Spaltstellen. Während das Peptid 1 nach dem Motiv <sup>65</sup>RAF<sup>67</sup> in der Region der potentiellen PopC-Spaltstelle von p25 gespalten wurde, zeigte das Peptid 2 eine Spaltung nach dem Motiv <sup>44</sup>KQK<sup>46</sup>. Diese Spaltprodukte konnten nicht mit inaktivem PopC<sup>S423A</sup> identifiziert werden. Da beide Peptide die Sequenz <sup>65</sup>RAF<sup>67</sup> enthalten, hätte auch das Peptid 2 hier gespalten werden können. Dies war jedoch nicht der Fall. Die Aminosäuren Arginin 65 und Phenylalanin 67 wurden bei der Untersuchung der Alaninsubstitutionen *in vitro*

analysiert. Beide Alaninsubstitutionsmutanten wurden von PopC in p17 prozessiert. Dies deutet darauf hin, dass diese Aminosäuren bei der PopC-Spaltung nicht essentiell sind.

Im Zuge dieser Arbeit deuten die Ergebnisse darauf hin, dass PopC im Aminosäuremotiv  $^{56}\text{LDV}^{58}$  spaltet (siehe unten). In beiden synthetischen Peptiden ist dieses Spaltmotiv vorhanden. Wie lässt sich erklären, dass die synthetischen Peptide an zwei sehr unterschiedlichen Positionen gespalten wurden, die sich von der tatsächlichen Spaltstelle unterscheiden? Die Analyse der Sekundärstruktur deutet darauf hin, dass die Peptide unterschiedliche Sekundärstrukturen haben. Daher besteht die Möglichkeit, dass die genaue Sekundärstruktur wichtig für die Spezifität von PopC ist. Es könnte auch sein, dass PopC die Peptide nur deshalb an den verschiedenen Spaltstellen prozessiert, weil diese für PopC in den Peptiden, im Gegensatz zum gefalteten p25 Protein, zugänglich sind.



**Abbildung 36: Zugänglichkeit der in den synthetischen Peptiden identifizierten Spaltmotive in p25.** **A:** Das Modell von p25 basiert auf den Aminosäuren 4-229 des Carbonylreduktase-Sniffers aus *D. melanogaster*. Die Sequenzidentität liegt bei 34% und der E-Wert bei  $1,01 \times 10^{-29}$ . Die in den Peptiden identifizierten Spaltmotive sind in orange dargestellt. **B:** Aminosäuresequenz von p25 mit PopC-Spaltmotiv  $^{56}\text{LDV}^{58}$  und den in den synthetischen Peptiden identifizierten Spaltmotiven  $^{44}\text{KQK}^{46}$  und  $^{65}\text{RAF}^{67}$ . **C:** Ausschnitt aus Homologiemodell.

Im Homologiemodell in Abbildung 36 wird deutlich, dass das Aminosäuremotiv  $^{44}\text{KQK}^{46}$  auf der Proteinoberfläche lokalisiert ist und demnach

für PopC zugänglich sein sollte. Die Aminosäuren <sup>65</sup>RAF<sup>67</sup> befinden sich in einer  $\alpha$ -Helix. Hier könnte man vermuten, dass dieses Motiv im gefalteten Protein aufgrund der  $\alpha$ -Helix nicht von PopC erreichbar ist. Letztlich ist es nicht eindeutig zu erklären, warum die synthetischen Peptide von PopC in der beobachteten Art und Weise prozessiert wurden.

Es wurde zusätzlich versucht, die PopC-Spaltstelle durch die Analyse von Spaltprodukten nach der PopC-Prozessierung von MalE-p25 per Massenspektrometrie zu bestimmen. Die Detektion von p17 in einem Coomassie-gefärbten SDS-Gel ist vermutlich aufgrund der geringen Konzentration von p17 nicht möglich. In einem Silber-gefärbten Gel ist p17 jedoch zu erkennen, da es eine deutlich höhere Detektionsgrenze besitzt. Im Gegensatz zu der Empfindlichkeit der Coomassie-Färbung von 10-100 ng Protein, liegt diese bei der Silberfärbung bei 100 pg-1 ng Protein (Miller *et al.*, 2006). In verschiedenen Ansätzen wurden Gelregionen, die p17 enthalten sollten, per Massenspektrometrie analysiert. Der überwiegende Teil der identifizierten Peptide tritt wiederholt auf, wobei das Peptid <sup>53</sup>IHALDVGDDDSVR<sup>65</sup> immer detektiert wurde. Da dieses Peptid im Bereich der potentiellen PopC-Spaltstelle liegt und letztlich auch das in dieser Arbeit identifizierte Spaltmotiv <sup>56</sup>LDV<sup>58</sup> enthält, wäre zu erwarten gewesen, dass dieses Peptid gespalten wird und daher nicht mehr detektierbar wäre. Eine Quantifizierung mittels Massenspektrometrie erweist sich als schwierig, so dass keine Abnahme der Konzentration dieses Peptids gemessen werden konnte. Eine Abnahme hätte auf die Spaltung dieses Peptids hinweisen können. Die Methode der Massenspektrometrie ist demnach nicht geeignet, um die PopC-Spaltstelle aus *E. coli* zu identifizieren.

Die PopC-Spaltstelle sollte durch die Analyse von verkürzten MalE-p25 Deletionsderivaten eingegrenzt werden. Neun MalE-p25 Deletionsderivate wurden mit Wildtyp-Zellextrakt bzw. gereinigtem PopC Protein auf eine PopC-abhängige Spaltung hin untersucht. Alle Fusionsproteine wurden in PopC-Abhängigkeit gespalten, wobei die Spaltprodukte ausgehend von MalE-p17.8 zunehmend kleiner wurden. Es ist davon auszugehen, dass die kleiner werdenden Spaltprodukte in den verkürzten Deletionsderivaten auf eine Spaltung zwischen dem MalE-tag und dem jeweiligen fusionierten p25-Derivat

zurückzuführen sind. Die PopC-Prozessierungen von MalE-p18.6 und MalE-p18.4 ergaben jeweils ein Spaltprodukt von derselben Masse wie p17 aus MalE-p25 unter Berücksichtigung der Auflösung einer SDS-PAGE. Daher wurde die Spaltstelle von PopC in der Aminosäuresequenz vermutet, die den Unterschied zwischen MalE-p18.6 und MalE-p17.8 ausmacht und sich somit in der Sequenz zwischen Alanin 55 und Serin 63 befindet.

Die Analyse der Alaninsubstitutionen führte zu dem Ergebnis, dass p25 im Spaltmotiv <sup>56</sup>LDV<sup>58</sup> prozessiert wird. Aus 15 *in vitro* getesteten Alaninsubstitutionen zeigt die Substitution MalE-p25<sup>D57A</sup> eine stark reduzierte PopC-Prozessierung. Dies zeigt, dass die Aminosäure Aspartat 57 für die PopC-Spaltung essentiell ist. Alle anderen Substitutionen zeigten keinen Einfluss auf die Effizienz der Spaltung. In der *in vivo* Studie wurden insgesamt neun Substitutionsmutanten analysiert. Fünf dieser neun Mutanten zeigten einen Defekt in der Ausbildung von Fruchtkörpern und Sporen: SA3613 (p25<sup>L51A</sup>), SA3607 (p25<sup>I53A</sup>), SA3610 (p25<sup>L56A</sup>), SA3611 (p25<sup>D57A</sup>) und SA3614 (p25<sup>V58A</sup>). Der Phänotyp war jedoch nur bei drei dieser Mutanten (SA3610, SA3611, SA3614) auf einen Defekt in der p17 Akkumulation zurückzuführen. Hervorzuheben ist dabei, dass die Substitution p25<sup>D57A</sup> auch *in vivo* keine PopC-Spaltung von p25 zeigt.

Wie kommt es zu dem Unterschied der PopC-Funktionalität zwischen den *in vitro* und *in vivo* Experimenten? Eine Vermutung ist, dass die Spaltstelle in den Alaninsubstitutionsmutanten *in vitro* beispielsweise durch eine veränderte Faltung der Proteine für PopC unzugänglich sein könnte. Die *in vivo* Studie ist in dieser Hinsicht die zuverlässigere Methode, da die Mutation bereits im Gen erfolgt und die Translation in *M. xanthus* direkt stattfindet. Dies lässt eine natürliche Proteinfaltung wie beim Wildtyp-Protein erwarten, so dass PopC p25 spezifisch spalten kann. Es könnte aber auch sein, dass *in vivo* ein zusätzlicher unbekannter Faktor vorhanden ist, der die Funktionalität und Spezifität von PopC erhöht. Die Voraussetzung für eine PopC-abhängige Spaltung von p25 *in vivo* ist die korrekte Lokalisation in der äußeren Membran. Daher sollte mittels Zellfraktionierung bestätigt werden, dass p25 in allen Mutanten korrekt lokalisiert ist.



Zwei der *in vivo* untersuchten Mutanten (SA3613 (p25<sup>L51A</sup>), SA3607 (p25<sup>L53A</sup>)) zeigen einen entwicklungsgestörten Phänotyp, der jedoch auf eine verminderte Konzentration an p25 zurückzuführen ist. Dies könnte daran liegen, dass p25 entweder nicht produziert oder nach der Produktion degradiert wird. Die Quantifizierung der *csgA* Transkriptmenge in diesen Mutanten könnte einen Hinweis darauf geben, warum es zu einer verminderten p25 Proteinkonzentration kommt. Wäre die *csgA* Konzentration in den Mutanten vergleichbar mit der des Wildtyps, könnte ein nachträglicher Abbau von p25 zu den verringerten Proteinmengen führen. Eine andere Möglichkeit wäre eine generelle verminderte *csgA* Konzentration, die auf eine fehlerhafte Transkription zurückzuführen wäre.

Bei den drei verbleibenden Mutanten SA3610 (p25<sup>L56A</sup>), SA3611 (p25<sup>D57A</sup>) und SA3614 (p25<sup>V58A</sup>) konnte durch Immunoblot Analysen gezeigt werden, dass p25 nicht mehr von PopC prozessiert werden kann. Demzufolge sind diese Aminosäuren für den Spaltprozess von PopC notwendig. Da die Substitution der Aminosäure Aspartat 57 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine Hemmung der PopC Spaltung zeigt, wird deutlich, dass diese Aminosäure essentiell für die PopC Spaltung ist. Die Aminosäuren, die die Spezifität einer Protease festlegen, sind entweder für die P<sub>1</sub> und/oder P<sub>4</sub> Position festgelegt (S8B) oder in ihren Positionen um die Spaltstelle variabel (S8A). Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten drauf hin, dass PopC p25 spezifisch spaltet und Aspartat 57 an der P<sub>1</sub> Position essentiell ist. Daher lässt sich schlussfolgern, dass PopC p25 nach Aspartat 57 prozessiert. Bei der Bestimmung einer Protease-Spaltstelle konzentriert man sich hauptsächlich auf die Aminosäuren *upstream* der Spaltstelle. Es können aber auch die Aminosäuren der P<sub>1</sub>'-P<sub>4</sub>' Positionen von entscheidender Bedeutung sein. Dies führt in Übereinstimmung mit der vorgeschlagenen PopC-Spaltstelle zu der Schlussfolgerung, dass die Aminosäure Valin 58 durchaus essentiell für die Spaltung sein kann.



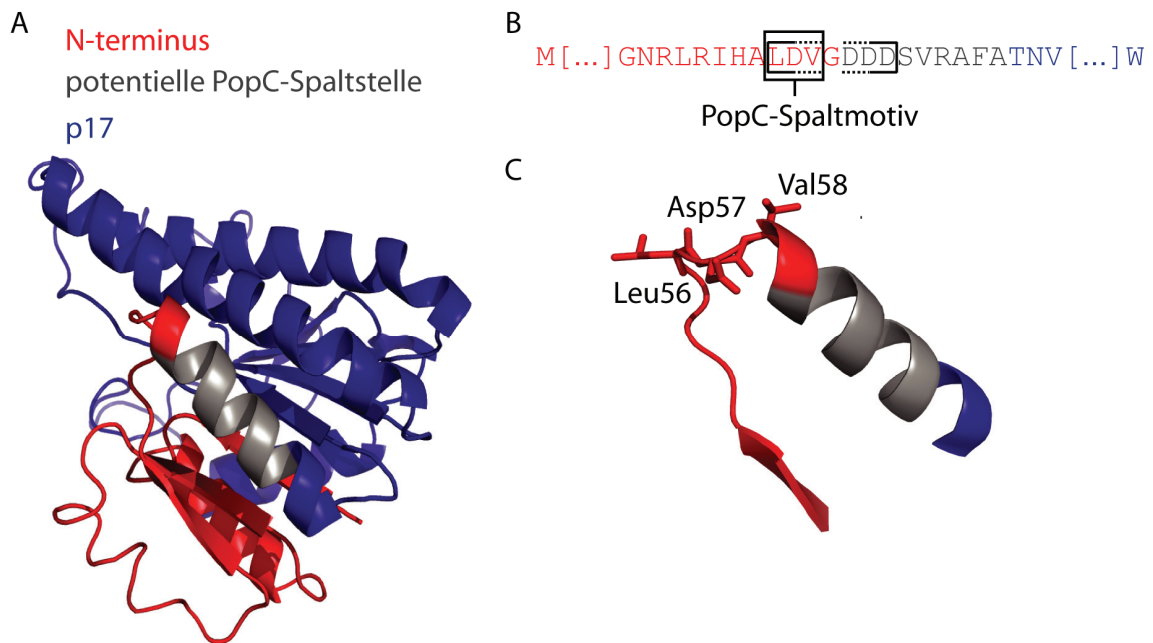
Subtilisin (Substrat)	Spaltmotiv	Konsensus-Sequenz	Ref
<b>S8B:</b>	$P_4 \quad P_2 \quad P_1 \downarrow P_1'$	$P_4 \quad P_3 \quad P_2 \quad P_1 \downarrow P_1'$	
Kexin (MF $\alpha$ 1 pro- $\alpha$ -factor; 104↓105)	---MYKR EA	R/K -R↓	1, 4
Furin (Diphtheria Toxin)	AGNRVRR SV	R -x- R/K -R↓	2, 3
<b>S8A:</b>	$P_4 \quad P_2 \quad P_1 \downarrow P_1'$	$P_4 \quad P_3 \quad P_2 \quad P_1 \downarrow P_1'$	
AasP (OmlA Peptide)	KELGVK DI	K↓DI	5
SKI-1/S1P (GP Lassa)*	RRLG GT	R/K-x-V/I/L-Z↓	6, 7
SphB1 (FhaB)* *	PLFETRIKFID	PLF <del>ETRIKFID</del>	8
PopC (p25)	IHALD VG	L -D↓V-	

**Abbildung 37: Übersicht der Spaltmotive verschiedener Subtilasen inklusive PopC.** In Anlehnung an Abbildung 6 wurden die Vertreter der Subtilisin-Unterfamilien S8A und S8B inklusive PopC zusammengefasst. Die Spaltstellen werden durch die Pfeile angezeigt. \* Z = jede Aminosäure, außer V, P, E, C. \*\* Spaltmotiv innerhalb dieser Sequenz, weggestrichene Aminosäuren in der Konsensus-Sequenz sind nicht für Spaltprozess essentiell. (Referenzen: 1 (Rockwell & Fuller, 1998); 2 (Tsuneoka *et al.*, 1993); 3 (Hosaka *et al.*, 1991); 4 (Rawlings *et al.*, 2010); 5 (Ali *et al.*, 2008); 6 (Lenz *et al.*, 2000); 7 (Seidah *et al.*, 2006); 8 (Coutte *et al.*, 2001)).

Inwieweit stimmt die hier identifizierte PopC-Spaltstelle mit den Spaltmotiven vergleichbarer Subtilasine überein? In der Abbildung 37 ist eine Übersicht der zuvor erwähnten Vertreter der Subtilisin-Unterfamilie S8A und S8B zusammengestellt, der nun PopC hinzugefügt wurde. Wir wissen von S8B-Subtilasen, dass die proteolytische Spaltung oft nach dibasischen Aminosäuren, wie Arginin oder Lysin erfolgt. Im PopC-Spaltmotiv fehlen diese Aminosäuren. Bei den S8A-Subtilasen gibt es verschiedene Beispiele: Für AasP aus *A. pleuropneumoniae* wird angenommen, dass diese Protease vor Aspartat 133 in KELGVKD<sup>133</sup>INSG spaltet (Ali *et al.*, 2008). Mit der PopC-Spaltung stimmt diese AasP-Spaltung dahingehend überein, dass ein Aspartat unmittelbar an der P<sub>1</sub> bzw. P<sub>1</sub>' Position des Spaltmotivs liegt. Die humane SKI-1/S1P spaltet das Glykoprotein des Lassavirus (Lenz *et al.*, 2000). Dabei ist ein Leucin, neben Isoleucin oder Valin, an der P<sub>2</sub> Position in der Konsensus-Sequenz essentiell. Dies stimmt mit den Ergebnissen dieser Arbeit insofern überein, dass ein Leucin an der P<sub>2</sub> Position des PopC-Spaltmotivs von Bedeutung ist. Bei SphB1 aus *B. pertussis* wird angenommen, dass die Spaltung in der Aminosäuresequenz <sup>2292</sup>PLFETRIKFID<sup>2302</sup> erfolgt, wobei die Aminosäuren Glutamat, Arginin, Lysin und Aspartat nicht für die Spaltung essentiell sind. Im Gegensatz zu den S8B-Subtilasen wird die Prozessierung

hier nicht von dibasischen Aminosäuren bestimmt, wie es auch bei PopC der Fall ist.

Letztendlich bleibt die Frage der Zugänglichkeit des Motivs im gefalteten Protein. Anhand des Homologiemodells von p25 wird deutlich, dass die Aminosäuren <sup>56</sup>LDV<sup>58</sup> in einer Loop-Region auf der Proteinoberfläche von p25 liegen und so optimal von PopC erreichbar wären (Abbildung 38).



**Abbildung 38: Zugänglichkeit des PopC-Spaltmotivs <sup>56</sup>LDV<sup>58</sup> in p25.** **A:** Das Modell von p25 basiert auf den Aminosäuren 4-229 des Carbonylreduktase-Sniffers aus *D. melanogaster*. Die Sequenzidentität liegt bei 34% und der E-Wert bei  $1,01 \times 10^{-29}$ . **B:** Aminosäuresequenz von p25 mit PopC-Spaltmotiv. **C:** Ausschnitt aus Homologiemodell mit beschriftetem PopC-Spaltmotiv.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit zur potentiellen Spaltstelle von p25 gezeigt werden, dass das Aminosäuremotiv <sup>56</sup>LDV<sup>58</sup> und insbesondere Aspartat 57 essentiell für eine erfolgreiche Spaltung durch PopC ist.

### 6.3 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass p25 im Spaltmotiv <sup>56</sup>LDV<sup>58</sup> nach Aspartat 57 durch PopC prozessiert wird. Mit der Substitution in Alanin wurde zunächst die generelle Bedeutung der spezifischen Aminosäuren untersucht. Im Folgenden sollte der Einfluss von Ladung oder Struktur dieser Aminosäuren analysiert werden. Dazu sollten Substitutionen durch Aminosäuren erfolgen, die ähnliche Eigenschaften wie die nativen Aminosäuren haben. Des Weiteren sollten die unmittelbar benachbarten Aminosäuren Alanin 55 und Glycin 59 in die Untersuchung einbezogen werden, um deren Relevanz bei der PopC-Spaltung zu analysieren.

Es bleibt weiterhin zu untersuchen, ob p25 in den Substitutionsmutanten korrekt in der äußeren Membran lokalisiert ist. Zur Vollständigkeit sollte die Exposition von p25 auf der Zelloberfläche in den Mutanten SA3610 (p25<sup>L56A</sup>), SA3611 (p25<sup>D57A</sup>) und SA3614 (p25<sup>V58A</sup>) bestätigt werden. Damit kann ausgeschlossen werden, dass das Unvermögen von PopC p25 zu spalten, auf eine inkorrekte zelluläre Lokalisation von p25 zurückzuführen ist. Daher könnten Zellfraktionierungen durchgeführt werden, um anschließend die Lokalisation von p25 im Vergleich zu Kontrollproteinen der verschiedenen Zellkompartimente (z.B. PilQ, PilC) zu untersuchen.

Mit der Identifikation der PopC-Spaltstelle in p25 ist es weiterführend möglich, Untersuchungen an p17 durchzuführen. Durch die Bestimmung des N-Terminus von p17 kann dieses Protein nun gezielt aus *E. coli* bzw. *M. xanthus* gereinigt werden, um beispielsweise die Kristallstruktur von p17 zu bestimmen. Dies könnte offene Fragen bezüglich der Assoziation von p17 in der äußeren Membran oder der Bindung an den vermuteten C-Signalrezeptor beantworten. Des Weiteren kann p17 weiterhin dazu benutzt werden, den C-Signalrezeptor zu identifizieren. Dazu wären z.B. Pulldown- oder Cross-linking Experimente mit gereinigtem p17 denkbar. Außerdem könnte zusätzlich in *Yeast-2-Hybrid* Experimenten mit der exakten Sequenz von p17 gezielt nach Interaktionspartnern gesucht werden.

Letztendlich erweitert die Bestimmung der PopC-Spaltstelle unser Wissen über spezifisch spaltende Subtilisin-ähnliche Serinproteasen im Generellen und über PopC im Speziellen.

## 7 Literaturverzeichnis

- Ali, T., Oldfield, N. J., Wooldridge, K. G., Turner, D. P. & Ala'Aldeen, D. A. (2008).** Functional characterization of AasP, a maturation protease autotransporter protein of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect Immun* **76**, 5608-5614.
- Avery, L. & Kaiser, D. (1983).** In situ transposon replacement and isolation of a spontaneous tandem genetic duplication. *Mol Gen Genet* **191**, 99-109.
- Baker, M. E. (1994).** *Myxococcus xanthus* C-factor, a morphogenetic paracrine signal, is similar to *Escherichia coli* 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase and human 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Biochem J* **301** ( Pt 1), 311-312.
- Barr, P. J. (1991).** Mammalian subtilisins: the long-sought dibasic processing endoproteases. *Cell* **66**, 1-3.
- Barrett, A. J., Tolle, D. P. & Rawlings, N. D. (2003).** Managing peptidases in the genomic era. *Biol Chem* **384**, 873-882.
- Berleman, J. E. & Kirby, J. R. (2009).** Deciphering the hunting strategy of a bacterial wolfpack. *FEMS Microbiol Rev* **33**, 942-957.
- Blow, D. M. (1997).** The tortuous story of Asp ... His ... Ser: structural analysis of alpha-chymotrypsin. *Trends Biochem Sci* **22**, 405-408.
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Bresnahan, P. A., Leduc, R., Thomas, L., Thorner, J., Gibson, H. L., Brake, A. J., Barr, P. J. & Thomas, G. (1990).** Human fur gene encodes a yeast KEX2-like endoprotease that cleaves pro-beta-NGF in vivo. *J Cell Biol* **111**, 2851-2859.
- Bulyha, I., Schmidt, C., Lenz, P., Jakovljevic, V., Hone, A., Maier, B., Hoppert, M. & Sogaard-Andersen, L. (2009).** Regulation of the type IV pili molecular machine by dynamic localization of two motor proteins. *Mol Microbiol* **74**, 691-706.
- Chen, Y. J. & Inouye, M. (2008).** The intramolecular chaperone-mediated protein folding. *Curr Opin Struct Biol* **18**, 765-770.
- Cho, K. & Zusman, D. R. (1999).** AsgD, a new two-component regulator required for A-signalling and nutrient sensing during early development of *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol* **34**, 268-281.
- Coutte, L., Antoine, R., Drobecq, H., Loch, C. & Jacob-Dubuisson, F. (2001).** Subtilisin-like autotransporter serves as maturation protease in a bacterial secretion pathway. *Embo J* **20**, 5040-5048.
- Coutte, L., Willery, E., Antoine, R., Drobecq, H., Loch, C. & Jacob-Dubuisson, F. (2003).** Surface anchoring of bacterial subtilisin important for maturation function. *Mol Microbiol* **49**, 529-539.
- Davis, J. M., Mayor, J. & Plamann, L. (1995).** A missense mutation in rpoD results in an A-signalling defect in *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol* **18**, 943-952.
- Downard, J., Ramaswamy, S. V. & Kil, K. S. (1993).** Identification of *esg*, a genetic locus involved in cell-cell signaling during *Myxococcus xanthus* development. *J Bacteriol* **175**, 7762-7770.

- Dworkin, M. (1973).** Cell-cell interactions in the myxobacteria. *Symp Gen Microbiol* **23**, 125–142.
- Dworkin, M. (1996).** Recent advances in the social and developmental biology of the myxobacteria. *Microbiol Rev* **60**, 70-102.
- Economou, A., Christie, P. J., Fernandez, R. C., Palmer, T., Plano, G. V. & Pugsley, A. P. (2006).** Secretion by numbers: Protein traffic in prokaryotes. *Mol Microbiol* **62**, 308-319.
- Ellehaug, E., Norregaard-Madsen, M. & Sogaard-Andersen, L. (1998).** The FruA signal transduction protein provides a checkpoint for the temporal co-ordination of intercellular signals in *Myxococcus xanthus* development. *Mol Microbiol* **30**, 807-817.
- Fuller, R. S., Brake, A. & Thorner, J. (1989).** Yeast prohormone processing enzyme (KEX2 gene product) is a Ca<sup>2+</sup>-dependent serine protease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 1434-1438.
- Garza, A. G., Harris, B. Z., Pollack, J. S. & Singer, M. (2000).** The asgE locus is required for cell-cell signalling during *Myxococcus xanthus* development. *Mol Microbiol* **35**, 812-824.
- Gerlach, R. G. & Hensel, M. (2007).** Protein secretion systems and adhesins: the molecular armory of Gram-negative pathogens. *Int J Med Microbiol* **297**, 401-415.
- Goldman, B. S., Nierman, W. C., Kaiser, D. & other authors (2006).** Evolution of sensory complexity recorded in a myxobacterial genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 15200-15205.
- Gronewold, T. M. & Kaiser, D. (2001).** The act operon controls the level and time of C-signal production for *Myxococcus xanthus* development. *Mol Microbiol* **40**, 744-756.
- Hagen, D. C., Bretscher, A. P. & Kaiser, D. (1978).** Synergism between morphogenetic mutants of *Myxococcus xanthus*. *Dev Biol* **64**, 284-296.
- Harris, B. Z., Kaiser, D. & Singer, M. (1998).** The guanosine nucleotide (p)ppGpp initiates development and A-factor production in *Myxococcus xanthus*. *Genes Dev* **12**, 1022-1035.
- Hart, B. A. & Zahler, S. A. (1966).** Lytic enzyme produced by *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **92**, 1632-1637.
- Hedstrom, L. (2002a).** Serine protease mechanism and specificity. *Chem Rev* **102**, 4501-4524.
- Hedstrom, L. (2002b).** An overview of serine proteases. *Curr Protoc Protein Sci* **Chapter 21**, Unit 21 10.
- Hillesland, K. L., Lenski, R. E. & Velicer, G. J. (2007).** Ecological variables affecting predatory success in *Myxococcus xanthus*. *Microb Ecol* **53**, 571-578.
- Hosaka, M., Nagahama, M., Kim, W. S., Watanabe, T., Hatsuzawa, K., Ikemizu, J., Murakami, K. & Nakayama, K. (1991).** Arg-X-Lys/Arg-Arg motif as a signal for precursor cleavage catalyzed by furin within the constitutive secretory pathway. *J Biol Chem* **266**, 12127-12130.
- Ijaz, M. K., Alkarmi, T. O., Sabara, M. I. & other authors (1995).** Characterization of a synthetic peptide mimicking trypsin-cleavage site of rotavirus VP4. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **18**, 145-160.
- Jelsbak, L. & Sogaard-Andersen, L. (2002).** Pattern formation by a cell surface-associated morphogen in *Myxococcus xanthus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 2032-2037.

- Kaiser, D. (1979).** Social gliding is correlated with the presence of pili in *Myxococcus xanthus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 5952-5956.
- Kaiser, D. (1993).** Roland Thaxter's legacy and the origins of multicellular development. *Genetics* **135**, 249-254.
- Kaiser, D. (2004).** Signaling in myxobacteria. *Annu Rev Microbiol* **58**, 75-98.
- Kaplan, H. B. & Plamann, L. (1996).** A *Myxococcus xanthus* cell density-sensing system required for multicellular development. *FEMS Microbiol Lett* **139**, 89-95.
- Kim, S. K. & Kaiser, D. (1990a).** Purification and properties of *Myxococcus xanthus* C-factor, an intercellular signaling protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 3635-3639.
- Kim, S. K. & Kaiser, D. (1990b).** C-factor: a cell-cell signaling protein required for fruiting body morphogenesis of *M. xanthus*. *Cell* **61**, 19-26.
- Kim, S. K. & Kaiser, D. (1991).** C-factor has distinct aggregation and sporulation thresholds during *Myxococcus* development. *J Bacteriol* **173**, 1722-1728.
- Kimura, Y., Saiga, H., Hamanaka, H. & Matoba, H. (2006).** *Myxococcus xanthus* twin-arginine translocation system is important for growth and development. *Arch Microbiol* **184**, 387-396.
- Konovalova, A., Petters, T. & Sogaard-Andersen, L. (2010).** Extracellular biology of *Myxococcus xanthus*. *FEMS Microbiol Rev* **34**, 89-106.
- Kroos, L. & Kaiser, D. (1987).** Expression of many developmentally regulated genes in *Myxococcus* depends on a sequence of cell interactions. *Genes Dev* **1**, 840-854.
- Kroos, L., Hartzell, P., Stephens, K. & Kaiser, D. (1988).** A link between cell movement and gene expression argues that motility is required for cell-cell signaling during fruiting body development. *Genes Dev* **2**, 1677-1685.
- Kruse, T., Lobedanz, S., Berthelsen, N. M. & Sogaard-Andersen, L. (2001).** C-signal: a cell surface-associated morphogen that induces and co-ordinates multicellular fruiting body morphogenesis and sporulation in *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol* **40**, 156-168.
- Kuner, J. M. & Kaiser, D. (1982).** Fruiting body morphogenesis in submerged cultures of *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **151**, 458-461.
- Kuspa, A., Kroos, L. & Kaiser, D. (1986).** Intercellular signaling is required for developmental gene expression in *Myxococcus xanthus*. *Dev Biol* **117**, 267-276.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lee, B. U., Lee, K., Mendez, J. & Shimkets, L. J. (1995).** A tactile sensory system of *Myxococcus xanthus* involves an extracellular NAD(P)(+)-containing protein. *Genes Dev* **9**, 2964-2973.
- Lenz, O., ter Meulen, J., Feldmann, H., Klenk, H. D. & Garten, W. (2000).** Identification of a novel consensus sequence at the cleavage site of the Lassa virus glycoprotein. *J Virol* **74**, 11418-11421.
- Leonardy, S., Miertzschke, M., Bulyha, I., Sperling, E., Wittinghofer, A. & Sogaard-Andersen, L. (2010).** Regulation of dynamic polarity switching in bacteria by a Ras-like G-protein and its cognate GAP. *Embo J* **29**, 2276-2289.



- Li, S., Lee, B. U. & Shimkets, L. J. (1992).** csgA expression entrains *Myxococcus xanthus* development. *Genes Dev* **6**, 401-410.
- Licking, E., Gorski, L. & Kaiser, D. (2000).** A common step for changing cell shape in fruiting body and starvation-independent sporulation of *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **182**, 3553-3558.
- Lobedanz, S. & Sogaard-Andersen, L. (2003).** Identification of the C-signal, a contact-dependent morphogen coordinating multiple developmental responses in *Myxococcus xanthus*. *Genes Dev* **17**, 2151-2161.
- Locht, C., Bertin, P., Menozzi, F. D. & Renault, G. (1993).** The filamentous haemagglutinin, a multifaceted adhesion produced by virulent *Bordetella* spp. *Mol Microbiol* **9**, 653-660.
- Magrini, V., Storms, M. L. & Youderian, P. (1999).** Site-specific recombination of temperate *Myxococcus xanthus* phage Mx8: regulation of integrase activity by reversible, covalent modification. *J Bacteriol* **181**, 4062-4070.
- Manoil, C. & Kaiser, D. (1980a).** Accumulation of guanosine tetraphosphate and guanosine pentaphosphate in *Myxococcus xanthus* during starvation and myxospore formation. *J Bacteriol* **141**, 297-304.
- Manoil, C. & Kaiser, D. (1980b).** Guanosine pentaphosphate and guanosine tetraphosphate accumulation and induction of *Myxococcus xanthus* fruiting body development. *J Bacteriol* **141**, 305-315.
- Mazar, J. & Cotter, P. A. (2006).** Topology and maturation of filamentous haemagglutinin suggest a new model for two-partner secretion. *Mol Microbiol* **62**, 641-654.
- Miller, I., Crawford, J. & Gianazza, E. (2006).** Protein stains for proteomic applications: which, when, why? *Proteomics* **6**, 5385-5408.
- Nakayama, K. (1997).** Furin: a mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins. *Biochem J* **327 ( Pt 3)**, 625-635.
- Nariya, H. & Inouye, M. (2008).** MazF, an mRNA interferase, mediates programmed cell death during multicellular *Myxococcus* development. *Cell* **132**, 55-66.
- Ng, W. L. & Bassler, B. L. (2009).** Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annu Rev Genet* **43**, 197-222.
- Nudleman, E., Wall, D. & Kaiser, D. (2006).** Polar assembly of the type IV pilus secretin in *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol* **60**, 16-29.
- O'Connor, K. A. & Zusman, D. R. (1991).** Development in *Myxococcus xanthus* involves differentiation into two cell types, peripheral rods and spores. *J Bacteriol* **173**, 3318-3333.
- Ogawa, M., Fujitani, S., Mao, X., Inouye, S. & Komano, T. (1996).** FruA, a putative transcription factor essential for the development of *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol* **22**, 757-767.
- Oldfield, N. J., Worrall, K. E., Rycroft, A. N., Ali, T., Wooldridge, K. G. & Ala'Aldeen, D. A. (2009).** AasP autotransporter protein of *Actinobacillus pleuropneumoniae* does not protect pigs against homologous challenge. *Vaccine* **27**, 5278-5283.
- Page, M. J. & Di Cera, E. (2008).** Serine peptidases: classification, structure and function. *Cell Mol Life Sci* **65**, 1220-1236.

- Plamann, L., Kuspa, A. & Kaiser, D. (1992).** Proteins that rescue A-signal-defective mutants of *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **174**, 3311-3318.
- Plamann, L., Davis, J. M., Cantwell, B. & Mayor, J. (1994).** Evidence that asgB encodes a DNA-binding protein essential for growth and development of *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **176**, 2013-2020.
- Plamann, L., Li, Y., Cantwell, B. & Mayor, J. (1995).** The *Myxococcus xanthus* asgA gene encodes a novel signal transduction protein required for multicellular development. *J Bacteriol* **177**, 2014-2020.
- Plamann, L., Kaplan, H.B. (1999).** *Cell-density sensing during early development in Myxococcus xanthus*. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Pugsley, A. P. (1993).** The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol Rev* **57**, 50-108.
- Rawlings, N. D. & Barrett, A. J. (1999).** MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* **27**, 325-331.
- Rawlings, N. D., Barrett, A. J. & Bateman, A. (2010).** MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* **38**, D227-233.
- Rockwell, N. C. & Fuller, R. S. (1998).** Interplay between S1 and S4 subsites in Kex2 protease: Kex2 exhibits dual specificity for the P4 side chain. *Biochemistry* **37**, 3386-3391.
- Rockwell, N. C., Krysan, D. J., Komiyama, T. & Fuller, R. S. (2002).** Precursor processing by kex2/furin proteases. *Chem Rev* **102**, 4525-4548.
- Rockwell, N. C. & Thorner, J. W. (2004).** The kindest cuts of all: crystal structures of Kex2 and furin reveal secrets of precursor processing. *Trends Biochem Sci* **29**, 80-87.
- Rodriguez-Soto, J. P. & Kaiser, D. (1997).** The tgl gene: social motility and stimulation in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **179**, 4361-4371.
- Roebroek, A. J., Schalken, J. A., Leunissen, J. A., Onnekink, C., Bloemers, H. P. & Van de Ven, W. J. (1986).** Evolutionary conserved close linkage of the c-fes/fps proto-oncogene and genetic sequences encoding a receptor-like protein. *Embo J* **5**, 2197-2202.
- Rolbetzki, A. (2007).** Aktivierung eines kontakt-abhängigen Signalsystems durch regulierte Proteolyse in *Myxococcus xanthus*: Philipps-Universität Marburg.
- Rolbetzki, A., Ammon, M., Jakovljevic, V., Konovalova, A. & Sogaard-Andersen, L. (2008).** Regulated secretion of a protease activates intercellular signaling during fruiting body formation in *M. xanthus*. *Dev Cell* **15**, 627-634.
- Rosenberg, E., Keller, K. H. & Dworkin, M. (1977).** Cell density-dependent growth of *Myxococcus xanthus* on casein. *J Bacteriol* **129**, 770-777.
- Saeki, K., Ozaki, K., Kobayashi, T. & Ito, S. (2007).** Detergent alkaline proteases: enzymatic properties, genes, and crystal structures. *J Biosci Bioeng* **103**, 501-508.
- Sager, B. & Kaiser, D. (1993).** Two cell-density domains within the *Myxococcus xanthus* fruiting body. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 3690-3694.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989).** *Molecular cloning, a laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.



- Sanford, R. A., Cole, J. R. & Tiedje, J. M. (2002).** Characterization and description of *Anaeromyxobacter dehalogenans* gen. nov., sp. nov., an aryl-halo-respiring facultative anaerobic myxobacterium. *Appl Environ Microbiol* **68**, 893-900.
- Schechter, I. & Berger, A. (1967).** On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun* **27**, 157-162.
- Seidah, N. G., Day, R., Marcinkiewicz, M. & Chretien, M. (1998).** Precursor convertases: an evolutionary ancient, cell-specific, combinatorial mechanism yielding diverse bioactive peptides and proteins. *Ann N Y Acad Sci* **839**, 9-24.
- Seidah, N. G. & Prat, A. (2002).** Precursor convertases in the secretory pathway, cytosol and extracellular milieu. *Essays Biochem* **38**, 79-94.
- Seidah, N. G., Khatib, A. M. & Prat, A. (2006).** The proprotein convertases and their implication in sterol and/or lipid metabolism. *Biol Chem* **387**, 871-877.
- Shah, I. M. & Dworkin, J. (2009).** Microbial interactions: bacteria talk to (some of) their neighbors. *Curr Biol* **19**, R689-691.
- Shimkets, L. J. & Dworkin, M. (1981).** Excreted adenosine is a cell density signal for the initiation of fruiting body formation in *Myxococcus xanthus*. *Dev Biol* **84**, 51-60.
- Shimkets, L. J., Gill, R. E. & Kaiser, D. (1983).** Developmental cell interactions in *Myxococcus xanthus* and the *spoC* locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 1406-1410.
- Shimkets, L. J. (1990).** Social and developmental biology of the myxobacteria. *Microbiol Rev* **54**, 473-501.
- Shimkets, L. J. & Rafiee, H. (1990).** CsgA, an extracellular protein essential for *Myxococcus xanthus* development. *J Bacteriol* **172**, 5299-5306.
- Siezen, R. J. & Leunissen, J. A. (1997).** Subtilases: the superfamily of subtilisin-like serine proteases. *Protein Sci* **6**, 501-523.
- Singer, M. & Kaiser, D. (1995).** Ectopic production of guanosine penta- and tetraphosphate can initiate early developmental gene expression in *Myxococcus xanthus*. *Genes Dev* **9**, 1633-1644.
- Sogaard-Andersen, L. & Kaiser, D. (1996).** C factor, a cell-surface-associated intercellular signaling protein, stimulates the cytoplasmic Frz signal transduction system in *Myxococcus xanthus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 2675-2679.
- Sogaard-Andersen, L., Overgaard, M., Lobedanz, S., Ellehauge, E., Jelsbak, L. & Rasmussen, A. A. (2003).** Coupling gene expression and multicellular morphogenesis during fruiting body formation in *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol* **48**, 1-8.
- Sogaard-Andersen, L. (2004).** Cell polarity, intercellular signalling and morphogenetic cell movements in *Myxococcus xanthus*. *Curr Opin Microbiol* **7**, 587-593.
- Spyranti, Z., Galanis, A. S., Pairas, G., Spyroulias, G. A., Manessi-Zoupa, E. & Cordopatis, P. (2010).** Synthetic peptides as structural maquettes of Angiotensin-I converting enzyme catalytic sites. *Bioinorg Chem Appl*, 820476.
- Sudo, S. & Dworkin, M. (1972).** Bacteriolytic enzymes produced by *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **110**, 236-245.

- Sudo, S. Z. & Dworkin, M. (1969).** Resistance of vegetative cells and microcysts of *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **98**, 883-887.
- Thaxter, R. (1892).** On the Myxobacteriaceae, a new order of Schizomycetes. *Bot Gaz* **17**, 389-406.
- Toure, B. B., Munzer, J. S., Basak, A., Benjannet, S., Rochemont, J., Lazure, C., Chretien, M. & Seidah, N. G. (2000).** Biosynthesis and enzymatic characterization of human SKI-1/S1P and the processing of its inhibitory prosegment. *J Biol Chem* **275**, 2349-2358.
- Tsuneoka, M., Nakayama, K., Hatsuzawa, K., Komada, M., Kitamura, N. & Mekada, E. (1993).** Evidence for involvement of furin in cleavage and activation of diphtheria toxin. *J Biol Chem* **268**, 26461-26465.
- Turk, B. E. (2009).** Mixture-based peptide libraries for identifying protease cleavage motifs. *Methods Mol Biol* **539**, 79-91.
- Ueki, T. & Inouye, S. (2005).** Identification of a gene involved in polysaccharide export as a transcription target of FruA, an essential factor for *Myxococcus xanthus* development. *J Biol Chem* **280**, 32279-32284.
- Viswanathan, P., Singer, M. & Kroos, L. (2006).** Role of sigmaD in regulating genes and signals during *Myxococcus xanthus* development. *J Bacteriol* **188**, 3246-3256.
- Viswanathan, P., Murphy, K., Julien, B., Garza, A. G. & Kroos, L. (2007).** Regulation of dev, an operon that includes genes essential for *Myxococcus xanthus* development and CRISPR-associated genes and repeats. *J Bacteriol* **189**, 3738-3750.
- Wall, D., Wu, S. S. & Kaiser, D. (1998).** Contact stimulation of Tgl and type IV pili in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **180**, 759-761.
- Wall, D., Kolenbrander, P. E. & Kaiser, D. (1999).** The *Myxococcus xanthus* pilQ (sglA) gene encodes a secretin homolog required for type IV pilus biogenesis, social motility, and development. *J Bacteriol* **181**, 24-33.
- Waters, C. M. & Bassler, B. L. (2005).** Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**, 319-346.
- Weis, S. (2007).** Identifizierung und Charakterisierung zweier für die Entwicklung essentieller Serin/Threonin-Proteinkinasen in *Myxococcus xanthus*. In *Fachbereich Biologie*: Philipps-Universität Marburg.
- Williams, P. (2007).** *Bacillus subtilis*: a shocking message from a probiotic. *Cell Host Microbe* **1**, 248-249.
- Wireman, J. W. & Dworkin, M. (1977).** Developmentally induced autolysis during fruiting body formation by *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **129**, 798-802.
- Wu, S. S. & Kaiser, D. (1995).** Genetic and functional evidence that Type IV pili are required for social gliding motility in *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol* **18**, 547-558.
- Wu, S. S., Wu, J. & Kaiser, D. (1997).** The *Myxococcus xanthus* pilT locus is required for social gliding motility although pili are still produced. *Mol Microbiol* **23**, 109-121.
- Yen, M. R., Tseng, Y. H., Nguyen, E. H., Wu, L. F. & Saier, M. H., Jr. (2002).** Sequence and phylogenetic analyses of the twin-arginine targeting (Tat) protein export system. *Arch Microbiol* **177**, 441-450.

**Zusman, D. R., Scott, A. E., Yang, Z. & Kirby, J. R. (2007).** Chemosensory pathways, motility and development in *Myxococcus xanthus*. *Nat Rev Microbiol* **5**, 862-872.

## Lebenslauf

### Persönliche Angaben

Name                      Meike Ammon

Geburtsdatum          24.04.1978 in Nordenham

### Ausbildungsdaten

10/2001-10/2006      *Studium der Biologie* an der Philipps-Universität, Marburg  
Schwerpunkte: Mikrobiologie, Tierphysiologie, Virologie, Parasitologie

12/2005-09/2006      *Diplomarbeit* in der Abteilung Ökophysiologie (AG Hedderich) am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg:  
Heterologe Expression und Aufreinigung des „Forkhead-associated-domain“-Proteins MXAN4899 aus *Myxococcus xanthus*

10/2006                  *Diplom* in Biologie (Dipl. Biol.)

10/2006-03/2011      *Promotion* in der Abteilung Ökophysiologie am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg  
10/2006-03/2008 AG Hedderich  
03/2008-10/2010 AG Søgaaard-Andersen:  
Analyse der subzellulären Lokalisation des C-Signalvorläuferproteins p25 und die Identifikation der PopC-Spaltstelle in p25 in *Myxococcus xanthus*

### Veröffentlichungen

Rolbetzki, A., Ammon, M., Jakovljevic, V., Konovalova, A. & Søgaaard-Andersen, L. (2008). Regulated secretion of a protease activates intercellular signaling during fruiting body formation in *M. xanthus*. *Dev Cell* 15, 627-634.

Marburg, März 2011

## Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

**„Analyse der subzellulären Lokalisation des C-Signalvorläuferproteins p25 und die Identifikation der PopC-Spaltstelle in p25 in *Myxococcus xanthus*“**

selbstständig verfasst, keine anderen als die im Text angegebenen Hilfsmittel verwendet und sämtliche Stellen, die im Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Werken entnommen sind, mit Quellenangaben kenntlich gemacht habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

---

Meike Ammon

---

Ort, Datum